

**MOLECULAR MODELLING OF GABA-AT REACTIVITY:
FROM SMALL REPRESENTATIVE MODELS TO THE FULL PROTEIN,
FROM MOLECULAR MECHANICS TO QUANTUM CHEMISTRY,
FROM STATIC TO DYNAMICS**

Hatice GÖKCAN

SUMMARY

Understanding enzymes and their catalytic mechanisms is very important in order to develop more effective drugs having little to no side effects. The active site residues of an enzyme may only be responsible for the facilitation of the enzymatic reaction or may be responsible for holding the substrates in place or both. In order to decipher the catalytic behaviour of enzymes, different approaches such as QM, MM-MD, and QM/MM can be used and their results can be correlated.

The quantum chemical approach is often the only reliable way to model chemical transformations. Unfortunately, the numerical solution of the Schrödinger equation becomes increasingly expensive in terms of computational power when size increases. Numerical procedures in quantum chemistry require the calculation of numerous integrals and the resolution of (non)-linear equations, thus limiting the size of the systems that can be modelled. As of today, only linear scaling approximate quantum chemical methods are capable of combining both the necessary speed and accuracy to model large biomolecular systems with reasonable CPU cost.

SEBOMD (SemiEmpirical Born-Oppenheimer Molecular Dynamics) is a method which is based on the Born-Oppenheimer approximation and uses a QM semiempirical NDDO Hamiltonian to perform molecular dynamics. It uses the linear scaling Divide & Conquer (D&C) algorithm to perform MD simulations of molecular systems. Today, the current D&C implementation is not the most efficient to run on very large supercomputers due to the diagonalization process of the Fock matrix. Thus, the diagonalization procedure should be optimized to be able to run MD simulations of molecular systems containing several hundreds of atoms.

The main aim of this thesis is to get a deeper understanding of the mechanistic insights of the reactivity and of the dynamics of the pyridoxal 5-phosphate (PLP) dependent enzyme γ -aminobutyric acid aminotransferase (GABA-AT). GABA-AT catalyzes the reaction in which GABA is degraded to succinic semialdehyde. Reduction of GABA concentration in the brain is at the origin of many neurological diseases, and since GABA cannot cross the blood brain barrier, it cannot be directly administered. As a consequence, the inactivation of GABA-AT is considered as a valid target for the development of antiepileptic drugs. Because GABA-AT resembles many other PLP-dependent enzymes, understanding it could be of importance for the broad community of biochemists and computational chemists who study such class of proteins. Our work has consisted of five stages to pursuit the comprehension of GABA-AT, and by extension that of PLP dependent enzymes.

First, the reaction and the preferred binding mode of the natural substrate GABA has been elucidated with different isomers by means of model systems with Density Functional Theory (DFT). The stereoelectronic differences between the studied structures enabled us to discuss the possible particularities of the transamination and HF elimination reactions in GABA-AT.

Second, the dynamics and the behavior of the enzyme has been studied with MM-MD through the use of apoenzyme, holoenzyme and holoenzyme with an inactivator. Our results demonstrate that several active site residues play a key role, and their protonation states as well as that of PLP require special attention.

Third, the effect of the active site residues in the inactivation mechanism has been investigated with the modeling of clusters at the QM level involving key residues. The biggest cluster has been modelled with 165 atoms and the effect of the solvent has been taken into account using implicit solvent. The inclusion of the active site residues within the models enabled us to emphasize the effects of these residues on the reactivity of GABA-AT. The presence of similar residues in many PLP dependent enzymes enabled us to provide some general aspects for modelling these enzymes.

Fourth, new diagonalization routines for the SEBOMD approach implemented in the Amber suite of programs, have been incorporated using LAPACK and SCALAPACK libraries, tested and evaluated. Our results showed that the main restriction on the improvement of the D&C algorithm is the diagonalization of the Fock matrix which is not efficient on parallel computers. However, when large number of cores were used in SEBOMD simulations of large systems, using LAPACK solvers with threads that are provided by Intel MKL did improve the efficiency of the SEBOMD calculations.

Fifth, reaction free energies of PLP containing systems have been investigated with SEBOMD simulations. Each molecular system contains 747 atoms and their reactivity has been simulated using umbrella samplings and the newly implemented diagonalization routines. This work is the first example of the SEBOMD simulations on chemical transformations, and provides some general insights on the capabilities of the SEBOMD methodology in modelling reactions and in computing reaction free energies.

**GABA-AT REAKTİVİTESİNİN MOLEKÜLER MODELLEMESİ:
KÜÇÜK TEMSİLİ MODELLERDEN TÜM PROTEİNE,
MOLEKÜLER MEKANİKTEN KUANTUM KİMYASINA,
STATİKTEN DİNAMİĞE**

Hatice GÖKCAN

ÖZET

Enzimlerin yapısal özelliklerinin ve katalitik mekanizmalarının anlaşılması daha etkili ve yan etkisi azaltılmış ilaçların geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır. Enzimin aktif bölgesinde yer alan amino asitler enzimatik reaksiyonların gerçekleşmesinde etkin rol alabilir ya da sadece substratın aktif bölgede tutulmasına yardımcı olabilir. Enzimlere ait katalitik özellikler kuantum mekanik, moleküler dinamik, ve kuantum mekanik/moleküler mekanik yöntemler ile araştırılabilir ve sonuçlar birbirleri ile ilişkilendirilebilir.

Kimyasal dönüşümlerin modellenmesinde elektronik özelliklerinde incelenmesi nedeniyle kuantum kimyasal yöntemler güvenilir yöntem olarak kullanılmaktadır. Ancak, Schrödinger denkleminin sayısal olarak çözülmesi, sistem boyutunun artması ile hesaplama zamanını arttırmakta ve sonuç olarak hesaplamaları zorlaştırmaktadır. Kuantum kimyasında sayısal prosedürler birçok integralin ve doğrusal/doğrusal olmayan denklemlerin çözülmesini gerektirmektedir. Bu nedenden ötürü, modellenebilecek sistem boyutu kısıtlanmaktadır. Günümüzde doğrusal ölçeklenmeyi sağlayan kuantum kimyası yöntemlerin kullanılması, gerek hız ve gerekse güvenilirliği sağlayarak kabul edilebilir işlemci zamanı ile büyük biyomoleküllerin modellenmesine izin vermektedir.

SEBOMD (SemiEmpirik Born-Oppenheimer Moleküler Dinamik), Born-Oppenheimer yaklaşımına dayanmakta olan bir yöntem olup moleküler dinamik hesaplamaları yapmak için semiempirik NDDO Hamiltonunu kullanmaktadır. Bu yöntem lineer ölçekleme için Böl ve Yönet (Divide & Conquer, D&C) algoritması kullanmaktadır. Ancak, bu algoritma işlemci sayısının çok fazla olması durumunda, Fock matrisinin köşegenleştirilmesi nedeni ile verimliliği azaltmaktadır. Bu nedenden ötürü köşegenleştirme prosedürü büyük moleküler sistemlere ait simülasyonların gerçekleştirilebilmesi için optimize edilmelidir.

Bu tezin ana amacı farklı ölçeklerde yöntemler kullanarak piridoksal 5-fosfat (PLP) bağımlı olan γ -aminobütirik asit aminotransferaz (GABA-AT) enziminin reaktivite ve dinamik özelliklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktır. GABA-AT enzimi GABA molekülünün süksinik semialdehide parçalanmasında görev almaktadır. GABA konsantrasyonunun beyinde azalması çeşitli nörolojik rahatsızlıkların ortaya çıkmasında ana etkenlerden biridir. GABA molekülünün kan-beyin bariyerini geçememesi nedeniyle GABA'nın enjeksiyon yolu ile verilmesi bir tedavi yöntemi olarak uygulanamamaktadır. Bu nedenden ötürü GABA-AT enziminin inaktivasyonu anti-epileptik ilaçların geliştirilmesinde doğruluğu tespit edilmiş bir hedef haline gelmiştir. GABA-AT enziminin bir çok PLP bağımlı enzim ile benzer özellikler sergilemesi, benzer enzimlerin de anlaşılmasını sağlaması açısından önemlidir. GABA-AT enzimine ait

reaktivite ve dinamik özelliklerin daha iyi anlaşılmasını sağlamak için gerçekleştirilen çalışma, beş farklı bölümden oluşmaktadır.

İlk bölümde, doğal substrat olan GABA molekülüne ait seçici bağlanma modu ile bu molekül ile enzim arasında gerçekleşen tepkime farklı izomerlerin de kullanılması ile kuantum mekanik seviyede incelenmiştir. Çalışmada Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi (DFT) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, yapılar arasındaki stereo-elektronik farklılıkların, transiminasyon ve HF eliminasyon tepkimeleri üzerindeki etkilerinin aydınlatılmasını sağlamıştır.

İkinci bölümde, GABA-AT enziminin dinamik özelliklerini incelemek üzere apoenzim, holoenzim ve inaktivatör bağlı holoenzimden oluşan üç farklı sistem tasarlanmış ve moleküler dinamik hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar aktif bölge amino asitlerinin görevlerini ve aminoasitler ile PLP kofaktörünün yük değerlerinin aktif bölge açısından önemini ortaya çıkarmıştır.

Üçüncü olarak, aktif bölge amino asitlerinin inaktivasyon mekanizmasına etkisi kuantum mekanik seviyesinde küme modelleri kullanılarak incelenmiştir. En büyük küme 165 atom içermektedir ve çözücü etkisi sürekli ortam yöntemi ile incelenmiştir. Aktif bölge amino asitlerinin modellere eklenmesi, bu amino asitlerin GABA-AT reaktivitesine olan etkisinin incelenmesini sağlamıştır. Benzer amino asitlerin bir çok PLP bağımlı enzimin aktif bölgesinde de bulunması, bu enzimlere ait modelleme çalışmalarına genel bir bakış açısı sağlamaktadır.

Dördüncü olarak, Amber program paketi içerisinde yer alan SEBOMD yaklaşımı için yeni köşegenleştirme rutinleri eklenmiştir. Yeni rutinler LAPACK ve SCALAPACK kütüphanelerinden seçilmiş, test edilmiş ve değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar D&C algoritmasında en önemli kısıtlamanın Fock matrisinin köşegenleştirilmesinden kaynaklandığını ve paralel bilgisayarlarda verimliliğin bu nedenden ötürü düşük olduğunu göstermiştir. Ancak, büyük moleküllere ait SEBOMD simülasyonlarında fazla miktarda işlemci kullanılması durumunda, Intel MKL kütüphanesi tarafından sağlanan LAPACK ile işlem parçacıklarının kullanılmasının verimliliği artırdığı görülmüştür.

Son olarak, GABA-AT inaktivasyonunda yer alan ve PLP kompleksleri içeren moleküllere ait reaksiyon serbest enerjileri, SEBOMD simülasyonları ile incelenmiştir. Her moleküler sistem PLP kompleksleri ile su moleküllerinden oluşturulmuştur ve toplam 747 atom içermektedir. Reaktivite, şemsiye örneklendirilmesi (umbrella sampling) ve bir önceki bölümde gerçekleştirilen çalışmalarda elde edilen ve programa eklenen köşegenleştirme rutinleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu bölüm, SEBOMD simülasyonlarının kimyasal geçişlerin modellenmesinde ilk defa kullanılmasına ait bir örnek teşkil etmesi açısından önemlidir. Aynı zamanda bu çalışma, SEBOMB yönteminin kimyasal tepkimelerin modellenmesinde ve tepkime serbest enerjilerinin hesaplanmasındaki yeteneklerine ait genel kavramları öne çıkarması açısından önem taşımaktadır.