

УДК 577.151.45

Предпочтительная конформация связывания канонических субстратов бутирилхолинэстеразы непродуктивна для экотиофата

А. С. Злобин^{1,2#}, А. О. Залевский^{1,2,3#,*}, Ю. А. Мокрушина², О. В. Карцева², А. В. Головин^{1,3}, И. В. Смирнов^{2,4,5}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

³Институт молекулярной медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, 119992, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

⁴Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», 101000, Москва, ул. Мясницкая, 20

⁵Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

Эти авторы внесли равный вклад в исследование.

*E-mail: aozalevsky@fbb.msu.ru

Поступило в редакцию 28.08.2018

Принято к печати 10.12.2018

РЕФЕРАТ Впервые на атомистическом уровне описано взаимодействие фермента бутирилхолинэстеразы с экотиофатом – популярным модельным соединением, аналогом боевых отравляющих веществ VX и VR. При помощи методов молекулярного моделирования обнаружена конкуренция между двумя конформациями экотиофата в активном центре. Первая, близкая к конформации для способа связывания субстратов холинового ряда – бутирилхолина и бутирилтиохолина, – является ингибирующей, так как не способна к реакции с ферментом; вторая, реакционноспособная, обладает существенно худшей оценкой энергии связывания. Таким образом, экотиофат совмещает черты ингибиторов двух типов: конкурентного и суицидального. Данное наблюдение поможет уточнить кинетическую схему реакции для аккуратной оценки кинетических констант, что особенно важно при дизайне новых вариантов бутирилхолинэстеразы, способных к полному циклу гидролиза фосфорорганических соединений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бутирилхолинэстераза, КМ/ММ, метадинамика, органофосфаты, экотиофат.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БуХЭ – бутирилхолинэстераза; ЕСН – экотиофат; RMSD – среднеквадратичное отклонение; КМ/ММ – гибридное, квантово-механическое/молекулярно-механическое моделирование; PAS – периферийный анионный сайт.

ВВЕДЕНИЕ

Бутирилхолинэстераза (БуХЭ) – фермент, который обладает широкой субстратной специфичностью, благодаря чему представляет значительный интерес в качестве объекта для создания антитодов против ядов на основе фосфорорганических соединений, например газов VX и VR [1, 2]. В то же время для холинэстераз характерна чрезвычайно сложная кинетическая схема реакции, обусловленная, в том числе, наличием дополнительного периферического анионного сайта связывания лиганда (PAS). Рассмотрение

PAS для характеристического субстрата БуХЭ – бутирилтиохолина – увеличивает общее количество состояний до восьми [3]. Если же субстрат способен вызывать необратимую инактивацию фермента из-за образования стабильного фосфорилированного комплекса, то кинетическая схема может усложниться еще больше. Одним из таких субстратов, сочетающих и холиновый фрагмент, и возможность инактивации, является экотиофат – менее токсичный аналог боевых отравляющих веществ V-серии, который используется в качестве модельного фос-

форорганического соединения при изучении реакционной способности бутирилхолинэстеразы и ее модификаций, устойчивых к инактивации. В нашей работе взаимодействие экотиофата с БУХЭ изучено с целью оценки применимости для них кинетических схем, предложенных для бутирилтиохолина.

Мы решили использовать методы молекулярного моделирования, так как они дают атомистическое понимание происходящих событий и ранее доказали свою эффективность для понимания механизмов реакции БУХЭ с некоторыми субстратами [4] и даже для рационального изменения БУХЭ и трансформации ее в кокаингидролизующий фермент [5].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Моделирование молекулярного докинга было проведено в пакете Autodock Vina [6]. Для докинга была выбрана структура БУХЭ PDB ID 1XLW, ковалентно конъюгированная с продуктом фосфорилирования экотиофатом – диэтилфосфатным остатком (DEP). DEP был удален, а недостающие остатки V377-D378-D379-Q380 и C66 достроены на основе структуры PDB ID 2XMD, так как структуры достаточно похожи (среднеквадратичное отклонение (RMSD), оцененное по всем тяжелым атомам, составило 0.4 Å). Структура экотиофата создана в пакете Avogadro [7]. Подготовку входных файлов и обработку результатов проводили при помощи инструментов пакета AutoDock Tools [8]. Ячейка для докинга была отцентрирована так, чтобы включать весь карман связывания. Размер ячейки составил 20 Å по всем измерениям. Для эффективного сканирования параметр «exhaustiveness» был установлен в значение 64 и проведены 20 независимых повторностей. Во время докинга фермент оставался жестким, в то время как лиганд имел все степени свободы.

Стартовые конфигурации БУХЭ с лигандом были взяты из процедуры докинга. Моделирование метадинамики и обработку результатов проводили как описано ранее [9]. В качестве коллективной переменной использовали расстояние O(Ser198)-P(ЕСН). Потенциал метадинамики величиной 2 кДж/моль и адаптивной шириной, рассчитанной на основании диффузионного критерия по предшествующим 220 шагам, накладывался каждые 220 шагов моделирования. Для каждого варианта связывания экотиофата сделано по три независимых реплики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск положения экотиофата в структуре бутирилхолинэстеразы человека (PBD ID 1XLW) проведен с помощью процедуры докинга. Особый интерес представляли положения экотиофата в активном центре, потенциально способные к прохождению

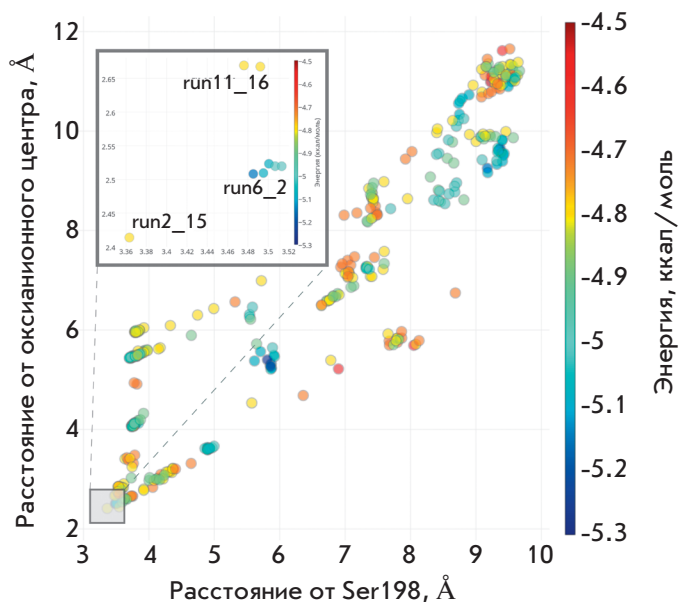


Рис. 1. Результаты докинга экотиофата в связывающий карман БУХЭ. Во врезке указаны лучшие результаты из нижнего левого сегмента

реакции (состояние ES в кинетической схеме [3]). Поэтому для анализа мы выбрали две основные метрики: расстояние между кислородом каталитического Ser198 и атомом фосфора экотиофата и расстояние между центром масс оксианионного центра, образованного атомами азота остова остатков G116, G117, A199, и фосфорильным кислородом экотиофата. Вторая метрика выбрана, так как координация кислорода оксианионным центром является важной составляющей связывания и позиционирования в известных механизмах реакции [3]. Фильтрация по таким критериям позволила выделить три лучших кластера положений run6_2, run2_15, run11_16 (рис. 1). Согласно оценочной функции AutoDock Vina, положение run6_2 имеет энергию связывания на ~0.4 ккал/моль лучше, чем два других. Интересно, что такое же расположение холинового фрагмента наблюдается в случае гидролиза ацетилтиохолина [4] и, по-видимому, характерно для лигандов подобной химической природы. В данном случае ключевым является взаимодействие положительного заряда холиновой группы с ароматической π-системой Trp82 [10]. Остаток Glu197, участвующий в катализе, при этом оказывает меньший эффект [10]. В то же время такое расположение лиганда приводит к тому, что уходящая группа – тиохолин – расположен не на линии нуклеофильной атаки.

В противоположность этому, в положении run11_16 тиохолин находится на одной линии с атакующим OG Ser198 (рис. 2), а расположение

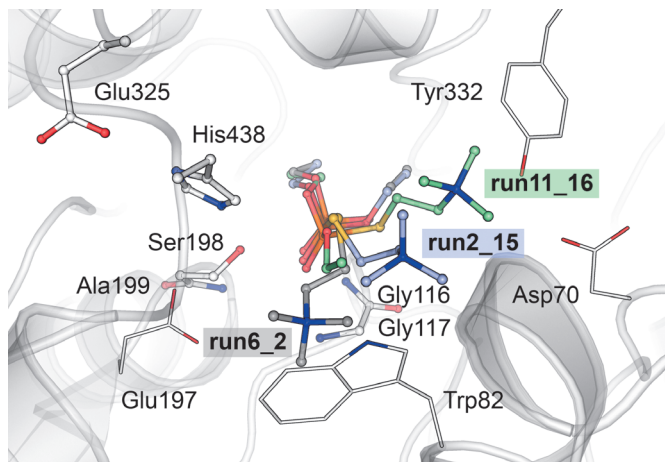


Рис. 2. Три варианта стартовых позиций лиганда. Остатки, включенные в квантовую систему, обозначены в шаростержневой модели. Тонкими линиями обозначены остатки, обеспечивающие связывание холинового фрагмента. Атомы углерода экотиофата в варианте связывания run6_2 показаны серым, run2_15 голубым и run11_16 зеленым. Отображение атомов водорода опущено

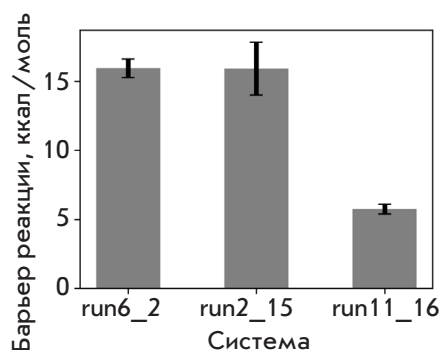


Рис. 3. Величины барьеров реакции для разных стартовых положений. Показано среднее значение и его ошибка, определенные по трем независимым измерениям

этильных заместителей похоже на расположение ковалентного интермедиата PDB ID 1XLW в кристаллической структуре [11]. Холиновая группа, в свою очередь, может электростатически взаимодействовать с отрицательно заряженным Asp70 и ароматической π-системой Tyr332, входящих в периферийный анионный сайт (PAS) [10]. Ранее предположили, что именно такое положение наиболее

вероятно для гидролиза экотиофата, а важность контакта с остатком Asp70 подтверждена серией мутантов Asp70Gly и Asp70Lys [12]. При этом связывание второй молекулы субстрата в PAS невозможно. Положение run2_15 является промежуточным – положение фосфата соответствует такому у run6_2, а холиновый хвост занимает переходное положение между run6_2 и run11_16 (рис. 2).

Для оценки реакционной способности всех трех положений мы применили гибридное квантово-механическое/молекулярно-механическое (КМ/ММ) моделирование. В совокупности с методом, повышающим эффективность семплирования – метадинамикой, это позволило оценить энергетические барьеры реакций [9].

Значения, полученные для run6_2, run2_15, run11_16, составляют 15.9 ± 0.7 , 15.9 ± 1.9 , 5.7 ± 0.4 ккал/моль соответственно (рис. 3). Они находятся в рамках, характерных для ферментативных реакций в целом, и соотносятся со значениями, полученными при изучении данной реакции в БУХЭ с другими субстратами и с помощью других вычислительных методов [5]. Но при этом замечен более низкий барьер реакции в системе, где стартовое положение лиганда таково, что уходящая группа – тиролин – находится на одной линии с атакующим кислородом OG Ser198, делает протекание реакции из подобного стартового положения приблизительно в 10^7 раз более вероятным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При помощи методов молекулярного моделирования мы обнаружили существование двух возможных конкурирующих конформаций экотиофата в активном центре бутирилхолинэстеразы. Существование первой, реакционноспособной, предсказано ранее. Вторая – близкая по режиму связывания к субстратам холиновой группы и обладающая лучшей оценкой энергии связывания, является ингибирующей. Учет обоих состояний позволит уточнить кинетическую схему реакции экотиофата с бутирилхолинэстеразой, что необходимо для корректной оценки кинетических констант при дизайне вариантов бутирилхолинэстеразы с фосфатазной активностью. ●

Исследование поддержано грантом РНФ № 14-50-00131. Все вычисления проводились на ресурсах суперкомпьютерного центра МГУ им. М.В. Ломоносова, поддержанных проектом RFMEFI62117X0011.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ilyushin D.G., Smirnov I.V., Belogurov A.A., Jr., Dyachenko I.A., Zharmukhamedova T.I., Novozhilova T.I., Bychikhin E.A., Serebryakova M.V., Kharybin O.N., Murashev A.N., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. P. 1243–1248.
2. Terekhov S.S., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Bobik T.V., Ilyushin D.G., Murashev A.N., Dyachenko I.A., Palikov V.A., Knorre V.D., Belogurov A.A., et al. // *Acta Naturae*. 2015. V. 7. P. 136–141.
3. Bevc S., Konc J., Stojan J., Hodošček M., Penca M., Praprotnik M., Janežič D. // *PLoS One*. 2011. V. 6. e22265.
4. Chen X., Fang L., Liu J., Zhan C.-G. // *Biochemistry*. 2012. V. 51. P. 1297–1305.
5. Zheng F., Xue L., Hou S., Liu J., Zhan M., Yang W., Zhan C.-G. // *Nature Comm*. 2014. V. 5. P. 3457.
6. Trott O., Olson A.J. // *J. Comp. Chem*. 2010. V. 31. P. 455–461.
7. Hanwell M.D., Curtis D.E., Lonie D.C., Vandermeersch T., Zurek E., Hutchison G.R. // *J. Cheminform*. 2012. V. 4. P. 17.
8. Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J. // *J. Comp. Chem*. 2009. V. 30. P. 2785–2791.
9. Zlobin A., Mokrushina Y., Terekhov S., Zalevsky A., Bobik T., Stepanova A., Aliseychik M., Kartseva O., Panteleev S., Golovin A., et al. // *Front. Pharmacol*. 2018. V. 9. P. 834.
10. Nachon F., Ehret-Sabatier L., Loew D., Colas C., van Dorselaer A., Goeldner M. // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 10507–10513.
11. Nachon F., Asojo O.A., Borgstahl G.E.O., Masson P., Lockridge O. // *Biochemistry*. 2005. V. 44. P. 1154–1162.
12. Masson P., Froment M.T., Bartels C.F., Lockridge O. // *Biochem. J*. 1997. V. 325 (Pt 1). P. 53–61.