

ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА
БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

УДК 577.35

МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ СПОНТАННОЙ
РЕАКТИВАЦИИ МУТАНТОВ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ,
ИНГИБИРОВАННОЙ ЭХОТИОФАТОМ

© 2022 г. С. В. Лушекина¹, А. В. Немухин^{1, 2*}, И. В. Поляков^{1, 2}, П. Массон³,
С. Д. Варфоломеев^{1, 2}, Б. Л. Григоренко^{1, 2}

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Институт фундаментальной медицины и биологии
Казанского федерального (Приволжского) университета, Казань, Россия

*E-mail: anet@lcc.chem.msu.ru

Поступила в редакцию 27.07.2021;

после доработки 12.08.2021;

принята в печать 20.08.2021

Методами молекулярного моделирования исследован механизм реакции реактивации двойного мутанта бутирилхолинэстеразы Asn322Glu/Glu325Gly, ингибированной фосфорорганическим соединением (ФОС) эхотиофатом. Способность данного мутанта к спонтанной реактивации была ранее показана экспериментально. Рассчитанный методом квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ) энергетический профиль пути реакции подтверждает, что подобный механизм возможен. При помощи молекулярно-динамических расчетов с потенциалами КМ/ММ исследованы пути переноса протона и определено протонированное состояние глутаминовых кислот активного сайта двойного мутанта. Методами классической молекулярной динамики исследованы возможные пути повышения его конформационной стабильности.

Ключевые слова: бутирилхолинэстераза, реактивация, молекулярная динамика.

DOI: 10.31857/S0207401X22020066

ВВЕДЕНИЕ

“Биоловушками”, “биочистильщиками” или “биоскавенджерами” называют биологические объекты (ферменты, каталитические антитела), способные связывать и/или гидролизовать фосфорорганическим соединением (ФОС). Их использование представляется наиболее эффективной альтернативой традиционным антидотам для нейтрализации или детоксикации ФОС. При этом основными требованиями являются широкий спектр действия и приемлемая стоимость производства большого количества фермента. Введение биоловух позволяет нейтрализовать молекулы токсиканта в кровотоке прежде, чем они достигнут своих биологических мишеней, обеспечивая тем самым защиту от отравления.

Биоловушки первого поколения нейтрализуют молекулы ФОС, стехиометрически связываясь с ними. Была показана безопасность и эффективность бутирилхолинэстеразы (БХЭ) человека при использовании ее для защиты от отравлений ФОС. Однако стехиометрическая нейтрализация ФОС требует введения огромного количества до-

рогостоящих биофармацевтических препаратов. Вторым поколением являются каталитические биоловушки – искусственные ферменты или катализаторы другого рода, способные расщеплять молекулы ФОС и восстанавливаться после реакции. Эти катализаторы либо расщепляют фосфорные эфиры (фосфотриэстеразная, органофосфат-гидролазная активность), либо превращают их в менее токсичные соединения за счет окисления алкильных либо арильных цепей. Недавно было опубликовано несколько обзоров, посвященных биоловушкам второго поколения [1–6].

Анализ конфигураций интермедиатов реакций спонтанной реактивации конъюгатов с различными ФОС нативной формы, полиморфных вариантов и искусственных мутантов БХЭ показывает, что ключевую роль в ходе реакции играет ориентация каталитического гистидина [7, 8]. В случае, когда атом азота N^ε имидазольного кольца и протон, полученный им в результате фосфорилирования или активации молекулы воды, лежат в одной плоскости с атомом O^γ каталитического серина, это облегчает переход протона, необхо-

димый для реактивации фермента. Это может быть достигнуто за счет изменения положения третьего члена каталитической триады — глутаминовой кислоты. По результатам анализа кристаллографической структуры положение 322 представляется наиболее перспективным для введения мутации, облегчающей переход протона. Двойная мутация БХЭ Asn322Glu/Glu325Gly благоприятствует сохранению функциональной каталитической триады и изменению угла наклона имидазольного кольца. Мутации, затрагивающие каталитические аминокислоты, зачастую являются губительными для фермента, но в данном случае экспериментально было показано, что БХЭ с этой мутацией сохраняет эстеразную активность [9].

Экспериментально было получено свидетельство того, что этот мутант способен к спонтанной реактивации после ингибирования эхотиофатом. К сожалению, из-за сниженной конформационной стабильности этого мутанта экспериментально получить количественные характеристики реакции реактивации не представляется возможным. Экспериментальный перебор большого количества модификаций мутанта Asn322Glu/Glu325Gly для повышения его конформационной стабильности требует эффективной системы экспрессии и существенных финансовых затрат. Методы молекулярного моделирования позволяют оптимизировать этот процесс.

Таким образом, целью данной работы было изучение механизма спонтанной реактивации двойного мутанта БХЭ Asn322Glu/Glu325Gly с использованием методов суперкомпьютерного моделирования, а также исследование возможных путей повышения его конформационной стабильности.

МОДЕЛИ И МЕТОДЫ

Модели

Для построения моделей в качестве источника координат была использована кристаллографическая структура БХЭ человека из банка данных PDB 1P0I [10]. Недостающие фрагменты белковой молекулы (боковые цепи отдельных аминокислотных остатков и атомы водорода) были восстановлены, как описано в [9]; мутации были внесены, как описано в [11]. Полученные модельные системы были полностью сольватированы молекулами воды; были добавлены ионы натрия и хлора для нейтрализации заряда и для обеспечения физиологической концентрации NaCl, равной 0.15 моль/л.

Молекулярная динамика

Молекулярно-динамическое (МД) моделирование проводилось с помощью программы NAMD

[12] в силовом поле CHARMM36 [13] согласно ранее опубликованному протоколу [14]. Для каждого мутанта были получены три параллельные траектории длиной 100 нс, которые использовались для анализа.

Метод квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ)

Построение энергетического профиля реакции методом КМ/ММ проводилось согласно протоколу, опубликованному ранее [9], с использованием программы NWChem [15] с функционалом электронной плотности PBE0 и базисом cc-pvdz. Молекулярно-механическая подсистема моделировалась с помощью силового поля AMBER [16].

Метод молекулярной динамики с потенциалами КМ/ММ

Молекулярно-динамические расчеты с потенциалами КМ/ММ проводились при помощи общего интерфейса программ TeraChem и NAMD [17] с использованием схемы электростатического внедрения с функционалом электронной плотности PBE0-D3 и базисом cc-pvdz и силового поля CHARMM36 для ММ-подсистемы. Параметры МД-протокола были такими же, как и для классических молекулярно-динамических расчетов. Для исследования путей переноса протона в систему был добавлен ион гидроксония между остатками Glu441 и Glu322.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спонтанная реактивация после ингибирования эхотиофатом

На рис. 1 показан профиль минимальной энергии вдоль пути реакции реактивации мутанта Asn322Glu/Glu325Gly, ингибированного эхотиофатом. На первом этапе происходит нуклеофильная атака молекулой воды, активируемой остатком каталитического гистидина His438, атома фосфора конъюгата с образованием пентакоординированного интермедиата. Энергетический барьер этой стадии составляет 8.2 ккал/моль. Далее происходит практически безбарьерная реориентация образовавшегося имидазольного катиона. Затем происходит одновременный перенос протона с имидазольного катиона на кислород каталитического серина Ser198 и перенос протона с образующегося диэтилфосфата обратно на тот же самый остаток каталитического гистидина. Известное из литературы значение $pK_a = 1.39$ [18] диэтилфосфата не противоречит этому механизму. Это приводит к высвобождению фермента с протонированным каталитическим гистидином, который может восстановить свою эффективность за счет

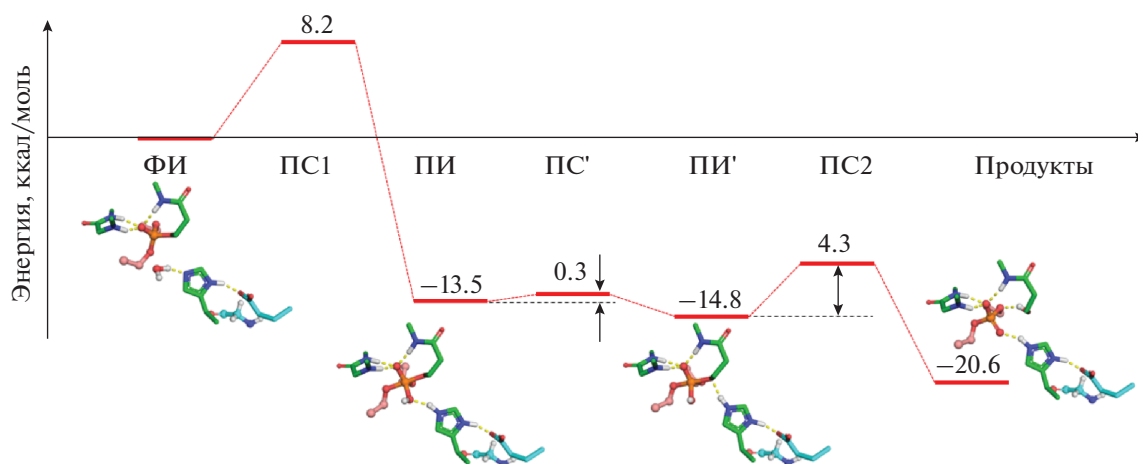


Рис. 1. Энергетический профиль реакции спонтанной реактивации мутанта Asn322Glu/Glu325Gly БХЭ, ингибированного эхотиофатом; ФИ – фермент-ингибиторный комплекс, ПС – переходное состояние, ПИ – пентакоординированный интермедиат.

переноса протона на остаток Glu197, обладающий аномально высокой основностью [8, 19, 20].

Полученные результаты свидетельствуют о протекании реакции спонтанной реактивации по механизму нуклеофильного присоединения-отщепления ($A_N + D_N$) [21]. Ориентация каталитического гистидина остатком новой каталитической глутаминовой кислоты Glu322 позволяет обеим стадиям – присоединению молекулы воды и отщеплению каталитического серина протекать с относительно низкими барьерами.

Протонированное состояние глутаминовых кислот активного сайта

Вопрос протонированного состояния двух некаталитических глутаминовых кислот активного сайта БХЭ Glu197 и Glu441, находящихся в непосредственной близости друг к другу, обсуждается в литературе на протяжении десятилетий [8]. Анализ конформационной подвижности мутанта Asn322Glu/Glu325Gly, выполненный с использованием метода цепей Маркова, показал, что протонированное состояние ионогенных групп, а именно двух некаталитических глутаминовых кислот активного сайта Glu197 и Glu441, оказывает существенное влияние на конформационные переходы в белке [9]. В рамках классической молекулярной динамики остался открытым вопрос перехода протона между молекулами воды и карбоксильными группами, окружающими активный сайт.

По результатам МД-расчетов с КМ/ММ-потенциалами в пределах доступных длин траекторий порядка десятков пикосекунд пути переноса протона оканчивались на Glu197. При этом пути

переноса протона включали также гидроксильную группу аминокислотного остатка Ser224, обменивающегося протоном с соседними молекулами воды, кратковременное протонирование Glu322 и лишь затем перенос протона через две молекулы воды на Glu197. После чего система с протонированным Glu197 была довольно стабильна без признаков дальнейшего переноса протона на соседние молекулы воды или аминокислотные остатки (рис. 2).

Предыдущие результаты микросекундного классического МД-моделирования и анализа с использованием метода цепей Маркова свидетельствуют о том, что такому протонированному состоянию присуща большая конформационная подвижность с преобладанием конформаций с оперативной каталитической триадой [9]. В то же самое время Glu197 в непротонированном состоянии за счет образования ионной пары стабилизирует имидазольный катион, образующийся в качестве промежуточной стадии реакции реактивации. Поддержку Glu197 в протонированном состоянии можно обеспечить путем замены Glu441 на глутамин, что предотвратит перенос протона с Glu197 при протонировании His438 [8]. Такая мутация, помимо прочих, была рассмотрена как вариант дальнейшей оптимизации рассматриваемого мутанта Asn322Glu/Glu325Gly.

Повышение конформационной стабильности

Аминокислотный остаток Asn322 не входит в непосредственное окружение каталитической триады, тем не менее он играет существенную роль в цепи водородных связей, поддерживающих целостность активного сайта. Ранее нами было пока-

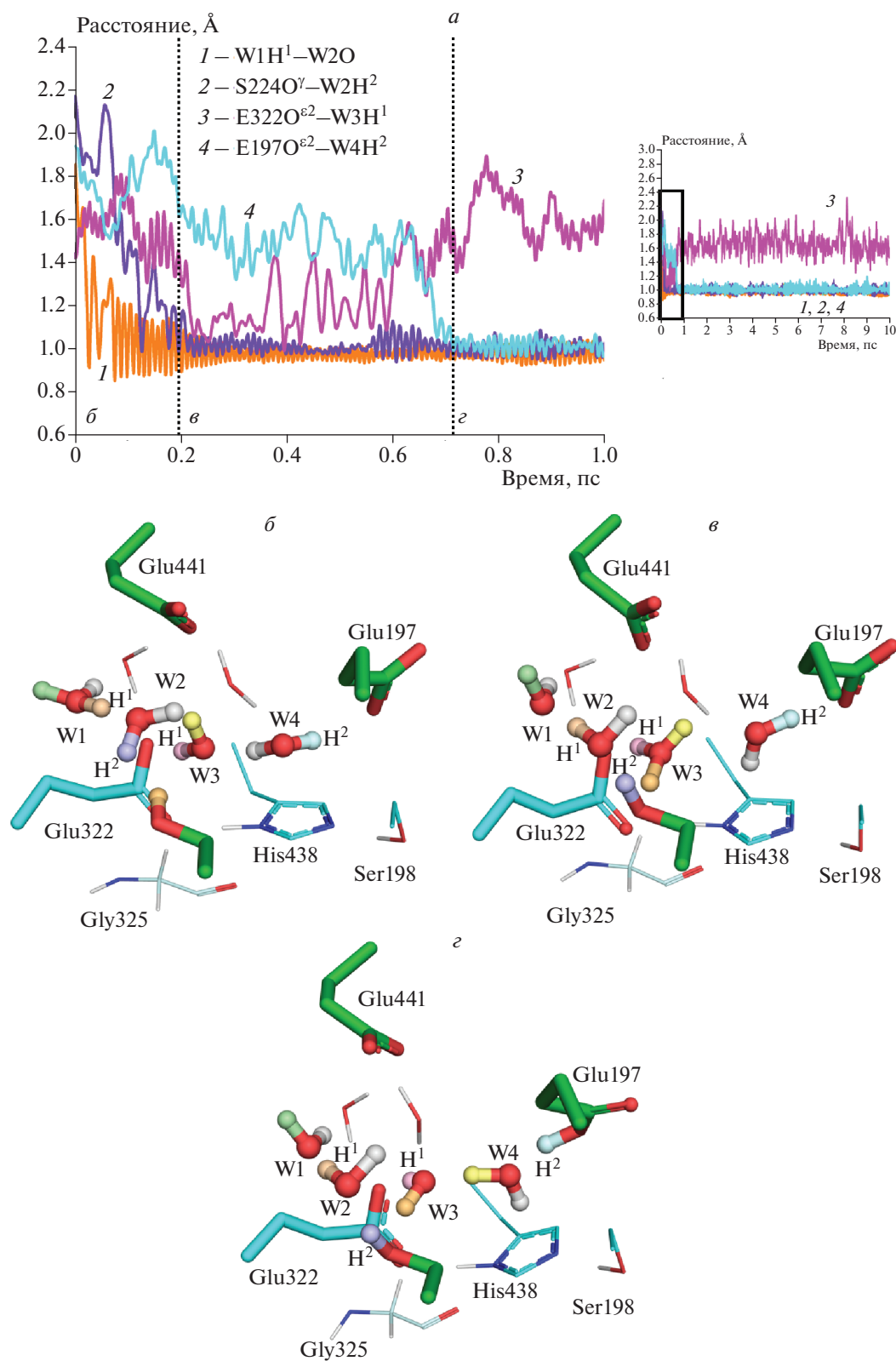


Рис. 2. Пути переноса протона в активном сайте двойного мутанта: *a* – изменение наиболее значимых расстояний между атомами кислорода и водорода вдоль КМ/ММ-МД-траектории; *б–г* – кадры траектории, соответствующие шагам, указанным на панели *a*; молекулы воды обозначены как W1, W2, W3, W4 и подписаны атомы водорода H¹, H², указанные на панели *a*.

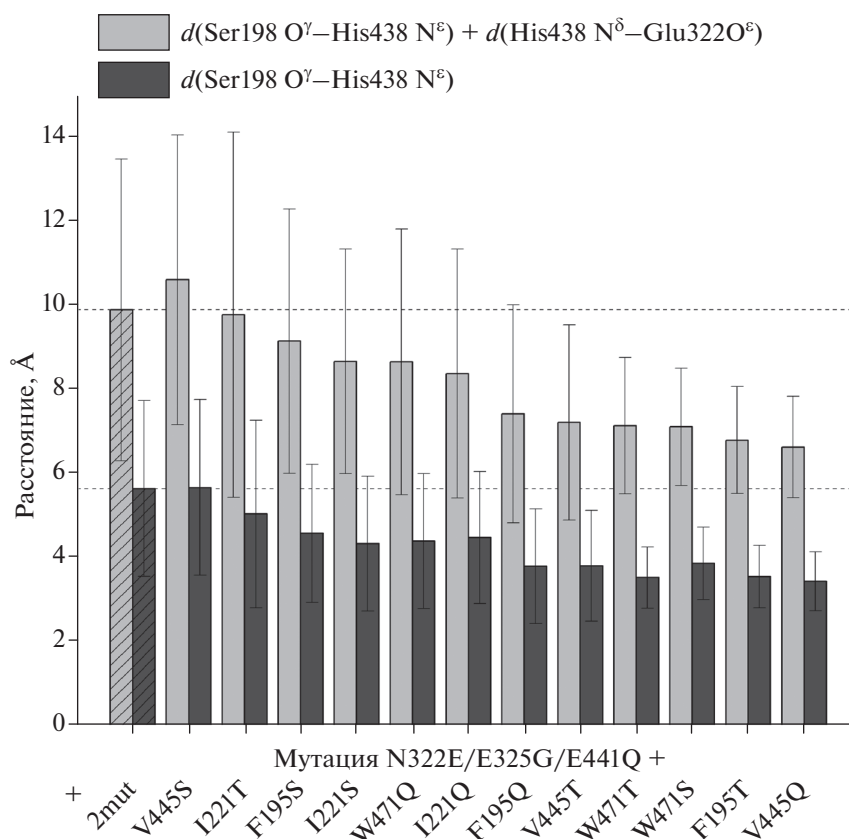


Рис. 4. Среднее расстояние d между каталитическими остатками по всем молекулярно-динамическим траекториям для мутантов БХЭ: 2mut – мутант Asn322Glu/Glu325Gly и его модификации.

миновая кислота в позиции 197 находится в протонированном состоянии. Показано, что введение дополнительных мутаций, обеспечивающих создание новой сети водородных связей, может повысить конформационную стабильность мутанта Asn322Glu/Glu325Gly.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 19-03-00076) с использованием оборудования Межведомственного суперкомпьютерного центра РАН и Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ им. М.В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Worek F., Thiermann H., Wille T. // *Toxicol. Lett.* 2016. V. 244. P. 143; <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.07.012>
2. Masson P., Lushchekina S.V. // *Chem.-Biol. Interact.* 2016. V. 259. P. 319; <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.02.010>
3. Masson P., Nachon F. // *J. Neurochem.* 2017. V. 142 Suppl 2. P. 26; <https://doi.org/10.1111/jnc.14026>
4. Goldsmith M., Ashani Y. // *Chem.-Biol. Interact.* 2018. V. 292. P. 50; <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.07.006>
5. Masson P., Lushchekina S. // *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents* / Ed. Gupta R.D. London: Acad. Press, 2020. P. 1199.
6. Lyagin I., Efremenko E. // *Intern. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22; <https://doi.org/10.3390/ijms22041761>
7. Lushchekina S.V., Schopfer L.M., Grigorenko B.L. et al. // *Front. Pharmacol.* 2018. V. 9. P. 211; <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00211>
8. Lushchekina S., Masson P. // *Toxicology.* 2018. V. 409. P. 91; <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.07.020>
9. Grigorenko B.L., Novichkova D.A., Lushchekina S.V. et al. // *Chem.-Biol. Interact.* 2019. V. 306. P. 138; <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.04.019>
10. Nicolet Y., Lockridge O., Masson P. et al. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 41141; <https://doi.org/10.1074/jbc.M210241200>
11. Григоренко Б.Л., Хренова М.Г., Кулакова А.М. и др. // *Хим. физика.* 2020, Т. 39. С. 13; <https://doi.org/10.31857/s0207401x20060023>
12. Phillips J.C., Braun R., Wang W. et al. // *J. Comput. Chem.* 2005. V. 26. P. 1781; <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>

13. *Best R.B., Zhu X., Shim J. et al.* // J. Chem. Theor. Comp. 2012. V. 8. P. 3257;
<https://doi.org/10.1021/ct300400x>
14. *Поляков И.В., Григоренко Б.Л., Немухин А.В.* // Хим. физика. 2021. Т. 40. С. 44;
<https://doi.org/10.31857/s0207401x21020138>
15. *Valiev M., Bylaska E.J., Govind N. et al.* // Comput. Phys. Commun. 2010. V. 181. P. 1477;
<https://doi.org/10.1016/j.cpc.2010.04.018>
16. *Case D.A., Cheatham T.E., 3rd, Darden T. et al.* // J. Comput. Chem. 2005. V. 26. P. 1668;
<https://doi.org/10.1002/jcc.20290>
17. *Khrenova M.G., Tsirelson V.G., Nemukhin A.V.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 2020. V. 22. P. 19069;
<https://doi.org/10.1039/d0cp03560b>
18. *Kumler W.D., Eiler J.J.* // J. Am. Chem. Soc. 1943. V. 65. P. 2355;
<https://doi.org/10.1021/ja01252a028>
19. *Amitay M., Shurki A.* // Proteins. 2009. V. 77. P. 370;
<https://doi.org/10.1002/prot.22442>
20. *Eslami M., Hashemianzadeh S.M., Bagherzadeh K. et al.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2016. V. 34. P. 855;
<https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1057526>
21. *Allen K.N., Dunaway-Mariano D.* // Trends Biochem. Sci. 2004. V. 29. P. 495;
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.07.008>
22. *Delacour H., Lushchekina S., Mabboux I. et al.* // PLoS One. 2014. V. 9. P. e101552;
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101552>