МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Новичкова Дана Александровна

Молекулярное моделирование структурно-динамических и каталитических характеристик холинэстераз различных типов

02.00.15 – кинетика и катализ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в лаборатории компьютерного моделирования отдела электроники органических материалов и наноструктур Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Научный руководитель	–	**Лущекина Софья Владимировна**, кандидат химических наук
Официальные оппоненты	–	**Коваленко Илья Борисович**, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник проблемной лаборатории космической биологии кафедры биофизики биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
		Никулин Алексей Донатович, доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории структурных исследований аппарата трансляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт белка Российской академии наук»
		Мазо Михаил Абрамович, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории физики и механики полимеров Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук

Защита диссертации состоится «29» октября 2020 г. 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, а также со сведениями о регистрации участия в защите в удаленном интерактивном режиме можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: https://istina.msu.ru/dissertations/260264698/

Автореферат разослан «22» сентября 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук И.К. Сакодынская

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Изучение структурно-динамических свойств белков представляет большой интерес как с фундаментальной, так и с прикладной точек зрения. Специфичность, аллостерическая модуляция, кооперативное взаимодействие, видовые различия связаны с динамикой белковых молекул, на которую влияют как аминокислотная последовательность самих белков, так и их окружение. Существующие методы молекулярного моделирования позволяют описать многие процессы, связанные с динамикой белковых молекул, однако для каждой изучаемой системы необходимо подбирать свой набор методов с учётом её особенностей и конкретной задачи.

В данной работе наибольшее внимание уделено исследованию связи структура-динамика-свойства холинэстераз и близких по структуре белков методами молекулярного моделирования. К холинэстеразам относится два фермента — ацетилхолинэстераза (АХЭ, КФ 3.1.1.7) и бутирилхолинэстераза (БХЭ, КФ 3.1.1.8). Ацетилхолинэстераза — ключевой фермент центральной нервной системы, используется в качестве мишени при терапии нейродегенеративных заболеваний, бутирилхолинэстераза — фермент, физиологическая функция которого до конца не ясна, но который способен связывать ряд ксенобиотиков, включая нервно-паралитические яды. Нейролигины — белки, участвующие в образовании синаптических контактов между нейронами, чьи внеклеточные участки структурно близки к холинэстеразам.

Выявление закономерностей формирования четвертичной структуры холинэстераз и близких по структуре белков в зависимости от первичной последовательности и динамики мономеров имеет как фундаментальное значение, позволяя выявить механизмы образования четвертичной структуры, так и практическое, поскольку стабильность четвертичной структуры влияет на устойчивость в кровотоке и является одним из критериев успешности биосинтеза.

Сравнение структуры, динамики и реакционной способности одного фермента из различных организмов на примере ацетилхолинэстераз *Homo sapience* и *Torpeda californica* является актуальной задачей, позволяя оценить возможность использования помимо ацетилхолинэстеразы человека ферменты других видов для разработки терапевтических препаратов на основе ингибиторов ацетилхолинэстеразы. Кроме того, сравнительный анализ позволяет выявить факторы, оказывающие влияние на динамику связывания субстратов и ингибиторов и формирования реакционноспособных комплексов в активном центре.

Нативная бутирилхолинэстераза человека ингибируется фосфорорганическими (ФОС) нервными ядами и не способна к спонтанной реактивации, в результате чего она связывает молекулы ФОС стехиометрически. Это делает возможным использование ее в качестве антидота при отравлениях нервными ядами, но требует большого количество белка, что сильно повышает стоимость такой терапии. Создание мутантов бутирилхолинэстеразы, способных к спонтанной реактивации, т.е. каталитическому расщеплению ФОС, является важной биомедицинской задачей. Описанные на настоящий момент самореактивирующиеся мутанты имеют недостаточно высокие скорости гидролиза ФОС для практического применения. Одной из сложностей, возникающей при разработке таких мутантов БХЭ является снижение их конформационной стабильности. Современные методы молекулярного моделирования позволяют исследовать влияние мутаций на реакционную способность и стабильность белковой молекулы, не прибегая экспрессии модифицированного фермента.

Работа является актуальной, поскольку полностью соответствует направлению из Стратегии НТР РФ (Указ Президента Российской Федерации от 1 декабря 2016 г. № 642 «О Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации) «Переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов».

Степень разработанности темы исследования. До начала работы над данной диссертацией имелись кристаллографические структуры исследуемых белков (кристаллографическая структура нейролигина 3 не опубликована) с кристаллографическим контактом, организованным по типу антипараллельного узла из альфа-спиралей. Для бутирилхолинэстеразы также получены кристаллографические структуры, в которых данный тип контакта отсутствует. Было показано, что узел из четырёх альфа-спиралей имеет определённые геометрические закономерности формирования, высказаны предположения о взаимодействиях, его стабилизирующих. Экспериментально описана кинетика взаимодействия ривастигмина с ацетилхолинэстеразами различных видов и показаны существенные различия для них. Экспрессированы и охарактеризованы мутанты бутирилхолинэстеразы, самореактивирующиеся после ингибирования фосфорорганическими соединениями, однако имеющие недостаточно высокие скорости гидролиза ФОС для практического применения. Опубликован ряд работ по молекулярному моделированию взаимодействия холинэстераз и ФОС, в том числе, предлагающих принципы создания новых мутантов, способных к спонтанной реактивации.

Цель работы – Развитие методики описания структурно-динамических свойств белков методами молекулярного моделирования и применение её к различным системам.

В соответствии с поставленной целью решались **следующие задачи**:

1. Выявление закономерностей формирования четвертичной структуры холинэстераз и близких по структуре белков в зависимости от первичной последовательности белков и динамики мономеров;
2. Сравнение структуры и динамики ферментов одного типа различных организмов на примере АХЭ человека и рыбы;
3. Исследование каталитического механизма медленного гидролиза ривастигмина АХЭ человека и рыбы;
4. Исследование влияния точечных мутаций на структурно-динамические свойства и стабильность активного центра фермента на примере БХЭ человека.

Объект и предмет исследования

В качестве модельных объектов выбраны молекулярные структуры ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7) различных видов: *Homo sapience* (чАХЭ), *Mus musculus* (мАХЭ), *Torpeda californica* (рАХЭ), *Drosophila melanogaster* (дАХЭ), бутирилхолинэстеразы (БХЭ, КФ 3.1.1.8) *Homo sapience* и нейролигина 3 (НЛГ3) *Homo sapience*.

Методология диссертационного исследования

В работе применялись различные методы молекулярного моделирования, их выбор производился с учётом поставленных задач. Для оценки энергии нековалентного связывания использовался метод молекулярного докинга. Энергические профили химических реакций в активном сайте фермента описывались комбинированным методом квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ) с описанием квантово-механической подсистемы методом функционала электронной плотности. Молекулярно-динамические расчеты по методу зонтичной выборки с обменом гамильтонианами применялась для расчёта профиля свободной энергии димеризации белков и перемещения ингибитора по каналу белка к активному центру. Для оценки вклада аминокислотных остатков интерфейсов димеризации в энергию нековалентного связывания мономеров белков выполнялся *in silico* аланиновый скрининг по методу возбуждения свободной энергии. Статистический анализ молекулярно-динамических траекторий с применением метода Маркова позволил выделить стабильные конформации и описать вероятности перехода между ними.

Научная новизна результатов

В рамках работы впервые:

1. Изучены типы взаимодействий между мономерами при образовании четвертичной структуры по типу узла из четырёх альфа-спиралей на примере холинэстераз и нейролигина 3.
2. Выявлены аминокислотные остатки, дающие наибольший вклад в стабилизацию контакта в холинэстеразах и нейролигине 3.
3. Установлено, что в процессе динамики димера бутирилхолинэстеразы одна из петель в области контакта имеет несколько метастабильных конформаций, в различной степени участвующих в стабилизации димера
4. Получены свободные энергии димеризации ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы человека.
5. Рассчитан профиль свободной энергии процесса перемещения ривастигмина по каналу ацетилхолинэстеразы человека и ацетилхолинэстеразы рыбы.
6. Построен профиль поверхности потенциальной энергии для реакции гидролиза ривастигмина ацетилхолинэстеразой человека.
7. Получены метастабильные конформации мутанта БХЭ с точечными заменами Asn322Glu/Glu325Gly с учётом различных протонированных состояний аминокислот активного центра.

Положения, выносимые на защиту

1. Статическая оценка количества стабилизирующих и дестабилизирующих аминокислотных взаимодействий недостаточна для количественного описания энергии димеризации. Для оценки энергии димеризации необходимо использовать методы, учитывающие динамику белка.
2. Для формирования узла из четырёх альфа спиралей необходимы гидрофобные взаимодействия между спиралями в области контакта, стабильность петель в районе контакта и возможность электростатического взаимодействия между петлями.
3. Межбелковый контакт в димере БХЭ менее стабилен, чем в АХЭ человека, за счёт большей подвижности петли в регионе связывания и меньшей гидрофобности поверхности контакта.
4. При взаимодействии ацетилхолинэстераз *Torpedo californica* и *Homo sapience* с ривастигмином лимитирующей стадией образования предреакционного фермент-ингибиторного комплекса является реориентация ингибитора в ограниченном пространстве активного центра для занятия реакционноспособного положения и разрыв водородных связей, стабилизирующих непродуктивное положение.

5. Низкая скорость стадии декарбамилирования реакции гидролиза ривастигмина АХЭ определяется строением карбамоилфермента и электростатическим влиянием уходящей группы стадии карбамилирования.
6. БХЭ человека с двойной мутацией Asn322Glu/Glu325Gly, затрагивающей каталитическую триаду, имеет несколько мета-стабильных конформаций и сохраняет каталитическую активность за счёт преобладания формы с активной каталитической триадой.

Личный вклад диссертанта заключается в сборе и анализе литературных данных, постановке задач на каждом этапе исследования, разработке или выборе методов их решения, проведении вычислений методом классической молекулярной динамики с последующим статистическим анализом по методу Маркова, методами КМ/ММ, молекулярного докинга, интерпретации результатов, подготовке публикаций и докладов по теме диссертационной работы.

Научная и практическая значимость данной работы заключается в детализации механизмов влияния структурно-динамических свойств белков на процессы димеризации и стабильность димеров изученных ферментов и на взаимодействие ферментов с ингибиторами. Результаты данной работы могут быть применены для разработки новых лекарственных препаратов на основе ферментов с повышенным временем жизни в кровотоке и повышенной ферментативной активностью по отношению к выбранным субстратам. Также работа представляет фундаментальный интерес, поскольку выявляет общие биофизические факторы формирования четвертичной структуры белков.

Степень достоверности

Работа выполнена на высоком уровне с использованием современных методов молекулярного моделирования. Использование этих методов обеспечило высокую надежность и достоверность полученных результатов.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на международной конференции 38th FEBS Congress (Санкт-Петербург 2013), международных конференциях «Ломоносов» (Москва 2014, 2015), XI, XIV, XVI ежегодных молодежных конференциях с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (Москва 2011, 2014, 201**6**), международной конференции «13th International Meeting of Cholinesterases – 7th-Paraoxonase Conference» (Храдец Кралове, Чехия, 2018), международной конференции «11th International Meeting of Cholinesterases» (Казань 2012), XXXVI всероссийском симпозиуме молодых ученых по химической кинетике (Московская область 2018), XI

международном конгрессе «Биотехнологии: состояние и перспективы развития» (Москва 2019).

Публикации

Основные результаты работы опубликованы в 4 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и RSCI, в 1 статье в сборнике и 10 тезисах докладов на российских и международных конференциях.

Связь работы с государственными программами

Работа выполнена при поддержке РФФИ (12-03-31039, «Интермедиаты и переходные состояния ферментативных реакций холинэстераз по результатам молекулярного моделирования», 13-04-40287-Н «Молекулярное моделирование механизмов взаимодействия ацетилхолинэстеразы, ее ингибиторов и бета-амилоидного пептида с целью разработки новых препаратов для фармакологической коррекции синаптической передачи возбуждения», 19-03-00043 «Квантово-химическое моделирование белковых комплексов») и РНФ (14-13-00124, «Суперкомпьютерное моделирование молекулярного полиморфизма ферментов человека»).

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов и списка цитируемой литературы из 136 наименований. Работа изложена на 117 страницах машинописного текста и включает 42 рисунка и 19 таблиц.

Глава 1 является литературным обзором, освещающим биологические функции холинэстераз, их медицинское применение, существующие данные об их строении и кинетике взаимодействия с ингибиторами. Подробно охарактеризованы ацетилхолинэстеразы различных видов: *Homo sapience* (чАХЭ), *Mus musculus* (мАХЭ), *Torpeda californica* (рАХЭ), *Drosophila melanogaster* (дАХЭ) и бутирилхолинэстераза (БХЭ) *Homo sapience*. Произведён обзор существующих кристаллографических структур холинэстераз. Для бутирилхолинэстразы также смоделированы димеры из кристаллографических структур, в которых контакт по типу узла из четырёх альфа спиралей отсутствует (***Рисунок 1***).

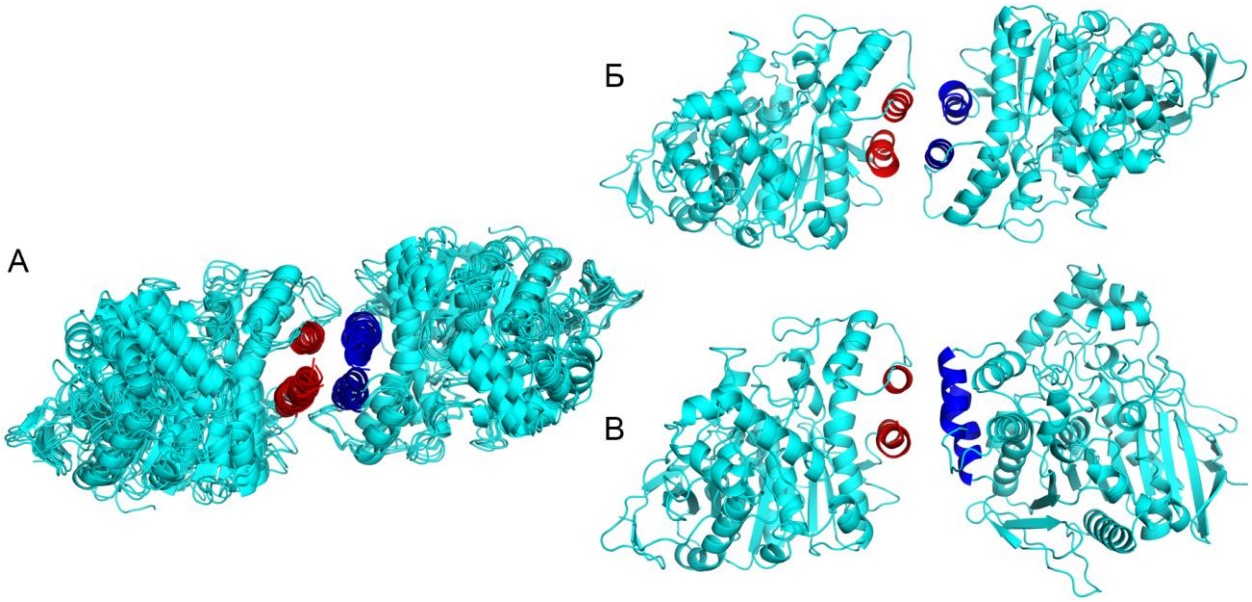


Рисунок 1. Димеры холинэстераз в кристаллографических структурах. А) наложение структур ацетилхолинэстераз Homo sapiens (PDB ID 4EY4), Mus musculus (PDB ID 1J06), Torpedo californica (PDB ID 1W76), Drosophila melanogaster (PDB ID 1QO9) – одинаковый тип димера независимо от организма источника. Б) димер бутирилхолинэстеразы без антипараллельного узла из четырёх альфа спиралей (PDB ID 1P0I) В) димер бутирилхолинэстеразы с каноническим антипараллельным узлом из четырёх альфа спиралей (PDB ID 4AQD).

В главе 2 производится анализ литературных данных о строении узла из четырёх альфа спиралей; освещены биологические функции нейролигинов – белков, также образующих узел из четырёх альфа спиралей – их медицинское применение, существующие данные об их строении. Подробно охарактеризован нейролигин 3, являющийся объектом настоящего исследования. Произведён филогенетический анализ и выравнивание последовательностей всех исследуемых белков, сделаны предварительные выводы о том, что области, отвечающие за образование контакта между двумя димерами, имеют больше сходства в аминокислотном составе, чем остальные части аминокислотной последовательности.

Глава 3 посвящена детальному анализу и сравнению строения димеров холинэстераз и нейролигина 3 методами компьютерного моделирования. Обосновывается выбор методов и приводятся основные результаты.

Молекулярно-динамическое моделирование и анализ полученных траекторий на предмет устойчивости образованного димера продемонстрировали, что в ходе моделирования отклонения угла между альфа-спиралями в узле от исходных кристаллографических структур, одинаковы и находятся в пределах статистической погрешности. Для этих и последующих расчётов для чАХЭ, рАХЭ, мАХЭ и БХЭ были получены 3 траектории длиной по 100 нс, для НЛГ3 одна траектория длиной 100 нс.

Эмпирическая **оценка аполярных взаимодействий** производилась как подсчётом контактов между гидрофобными центрами, так и расчётом изменения поверхности, доступной для растворителя, и для кристаллографических структур, и для отдельных кадров молекулярно-динамических траекторий. Количество образованных контактов практически постоянно для всех кристаллографических структур чАХЭ и стабильно велико для всех димеров с узлом из четырёх альфа-спиралей, кроме димера БХЭ. Значения изменения поверхности, доступной для растворителя, для кристаллографических структур, до молекулярно-динамического (МД) моделирования, входят в интервал значений для кадров молекулярно-динамических траекторий, что говорит о том, что при МД моделировании в водном растворе структура границы раздела димеров существенно не нарушается по сравнению с границей раздела димеров в кристаллах.

Полярная энергия связывания была рассчитана по линеаризованному уравнению Пуассона-Больцмана с учётом кулоновского притяжения мономеров друг в другу. Показано, что наибольший стабильный вклад в электростатическую энергию связывания производят заряженные остатки на петлях в районе контакта. Солевые мостики, образующиеся между альфа-спиралями, нестабильны на протяжении молекулярно-динамической траектории и разрушены в некоторых кристаллографических структурах.

Для аминокислотных остатков интерфейсов димеризации выполнялся ***in silico* аланиновый скрининг** двумя методами. Для аланинового скрининга были отобраны аминокислоты, участвующие в формировании контактов согласно предыдущим данным. Аланиновый скрининг при помощи веб-интерфейса Robetta требует меньшего количества вычислительных ресурсов, однако не учитывает конформационные изменения белка при замене исходной аминокислоты на аланин и участие исходной аминокислоты в динамике белка. В качестве исходных структур для аланиного скрининга при помощи сервера Robetta было выбрано по пять структур из наиболее отличающихся кластеров, полученных в результате анализа молекулярно-динамических траекторий. По результатам расчёта, аминокислоты, участвующие в гидрофобных взаимодействиях между спиралями, оказывают больший стабилизирующий эффект на контакт, чем аланин, этот эффект сохраняется от структуры к структуре. Наибольшие расхождения между структурами связаны с заменами гидрофильных остатков, участвующих в создании солевого мостика, и остатков на петлях бутирилхолинэстеразы.

Аланиновый скрининг по методу возбуждения свободной энергии произведён в режиме гость-хозяин. В этом режиме разница в энергии димеризации оценивается по термодинамическому циклу, изображённому на рисунке 2, по формуле:

$$\Delta\Delta G = \Delta G^{\text{димеризации}}_{\text{дикий тип}} - \Delta G^{\text{димеризации}}_{\text{мутант}} = \Delta G^{\text{мутации}}_{\text{два мономера}} - \Delta G^{\text{мутации}}_{\text{димер}}$$

где $\Delta G_{мут}$ оценивается по алгоритму т.н. «алхимических трансформаций».

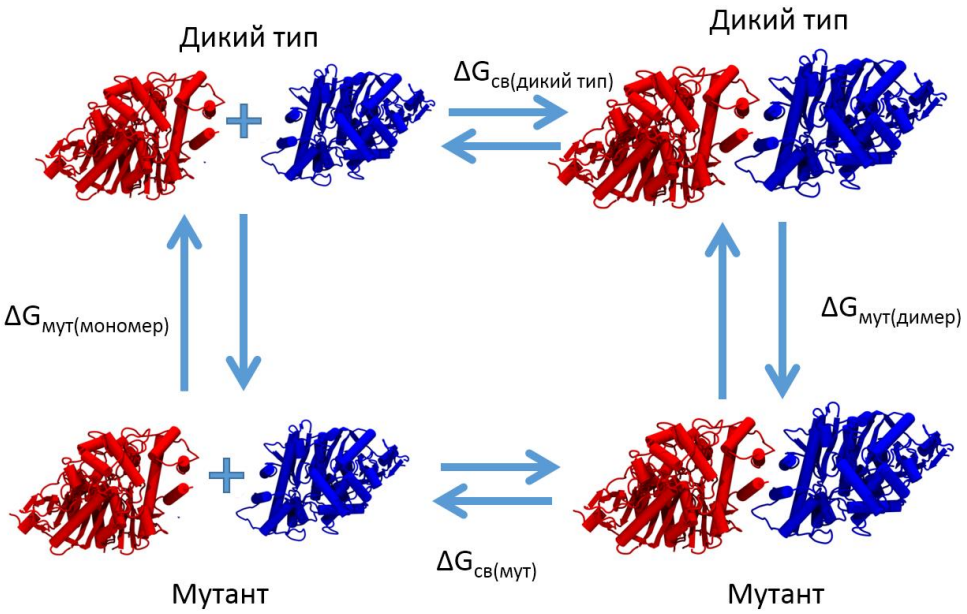


Рисунок 2. Термодинамический цикл для расчёта изменения энергии при мутации на аланин в режиме гость-хозяин.

Результаты аланинового скрининга для чАХЭ приведены на рисунке 3. Полученные результаты свидетельствуют о том, что дестабилизирующими димер выступают гидрофильные остатки между альфа-спиралями (однако их количество мало) а также остаток Phe531.

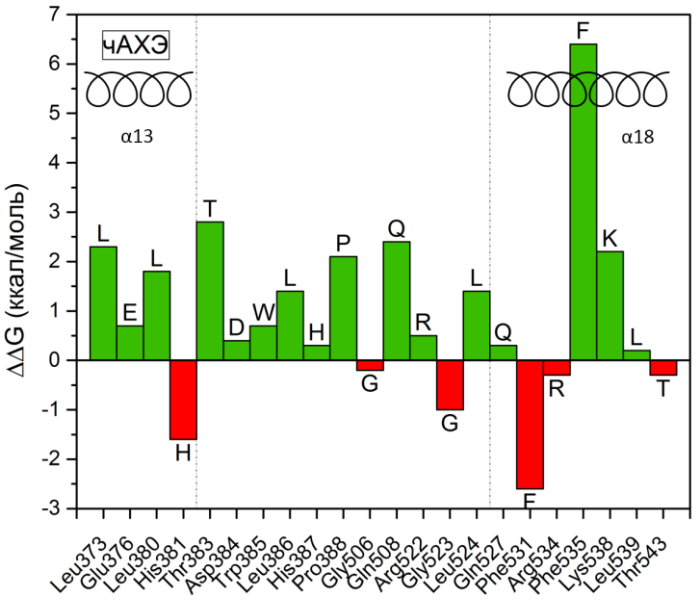


Рисунок 3. ΔΔG, ккал/моль димеризации чАХЭ при поочередной замене аминокислотных остатков на аланин по методу возбуждения свободной энергии.

По результатам аланинового скрининга для рАХЭ можно отметить, что гидрофильные остатки на альфа-спиралях контакта оказывают дестабилизирующий эффект, как и в случае

чАХЭ. Также распределение ионогенных аминокислотных остатков между петлями приводит к электростатическому притягиванию между мономерами.

БХЭ имеет меньше стабилизирующих аминокислот в петлях по сравнению с чАХЭ (***Рисунок*** 4). Аминокислотами, неблагоприятными для димеризации БХЭ, являются:

1) полярные (например, серин) аминокислоты вместо гидрофобных в спиралях в области контакта;

2) Asp375 и Asp378, которые за счет отталкивания дестабилизируют петлю.

На протяжении молекулярно-динамической траектории димера БХЭ молекулы воды образуют поток между альфа-спиралями поверхности контакта, что снижает стабильность димера.

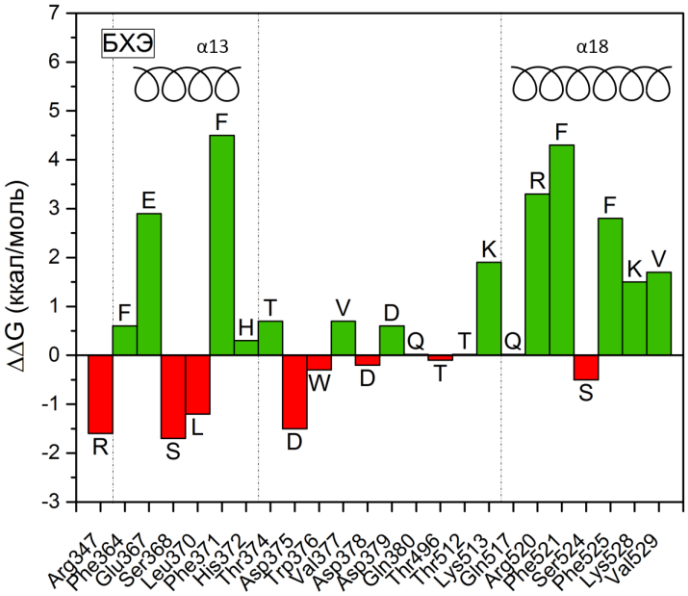


Рисунок 4. ΔΔG, ккал/моль димеризации БХЭ при поочередной замене аминокислотных остатков на аланин по методу возбуждения свободной энергии.

Роль конформационных изменений при образовании узла из четырёх альфа спиралей была оценена при помощи метода цепей Маркова. В применении к анализу молекулярно-динамических траекторий, суть метода состоит в том, чтобы выделить состояния (заданные совокупностью выбранных координат), переходы между которыми удовлетворяют критериям статистики цепей Маркова (вероятность каждого последующий перехода не зависит от истории переходов) и рассчитать вероятность переходов. В качестве координат нами были выбраны φ, ψ и χ торсионные углы 374-382 аминокислотных остатков (нумерация БХЭ). Подобный выбор сделан на основе анализа молекулярно-динамической траектории: среди белковых сегментов, которые вносят значительный вклад в димеризацию, эта петля является наиболее гибкой. Для последующего уменьшения количества координат, необходимого для лучшей кластеризации, был использован

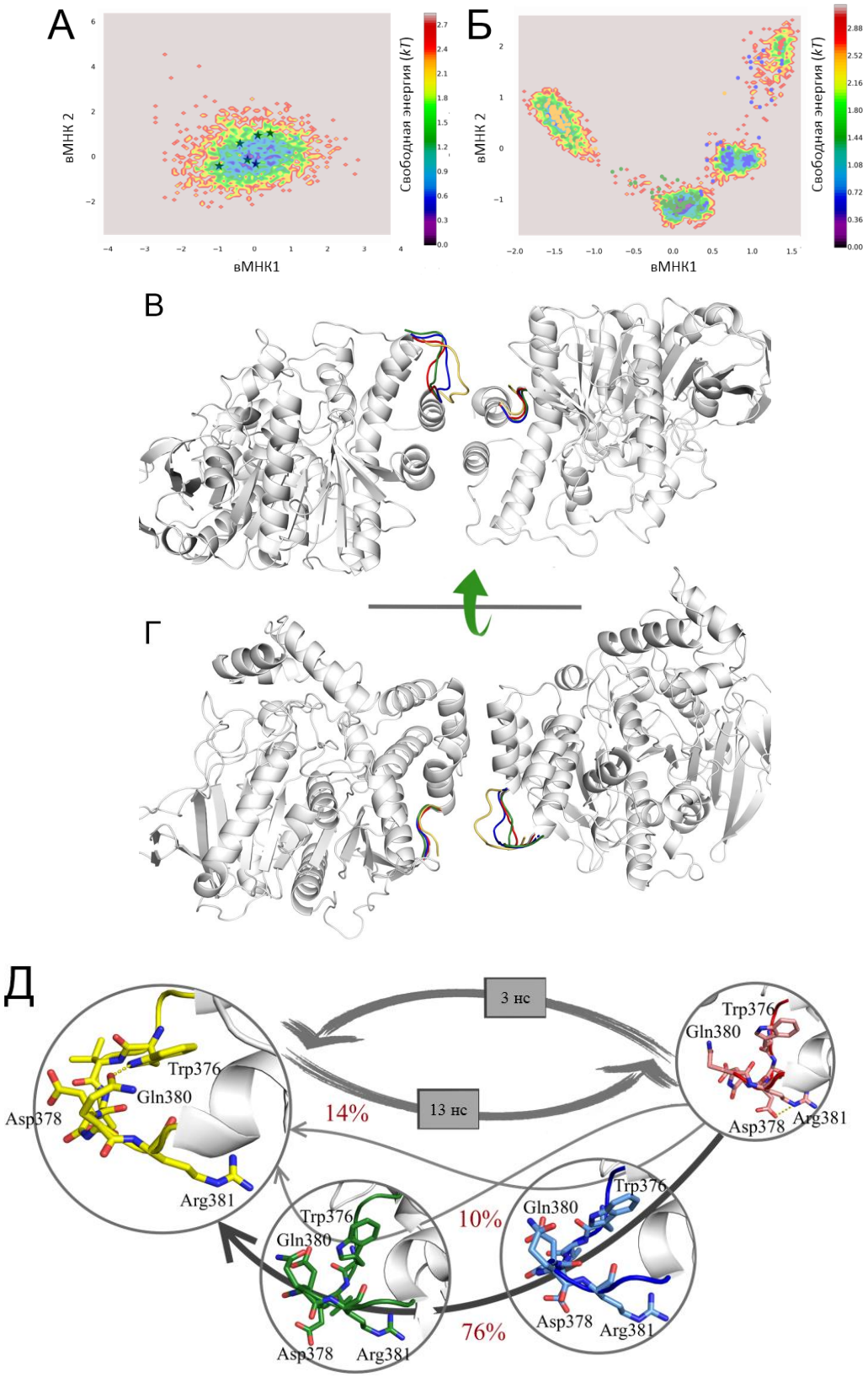


Рисунок 5. (А, Б) поверхности свободной энергии для чАХЭ и БХЭ в координатах вМНК1 и вМНК2. (В, Г) Димер БХЭ, вид сверху и сбоку, петли окрашены в соответствии с макросостояниями, к которым относятся. (Д) Пути перехода между макросостояниями и времена самых медленных переходов. В процентах указана популярность пути перехода.

временной метод независимых компонент (вМНК), являющийся наиболее удачным выбором для поиска конформационных переходов, происходящих редко. Для построения макросостояний был использован наиболее оптимальный метод *k*-средних по алгоритму Вороного, при котором минимизируется суммарное квадратичное отклонение точек кластеров от центров этих кластеров.

Анализ вМНК и последующий анализ поверхности свободной энергии для чАХЭ и мАХЭ показывает, что существует только одно макросостояние (***Рисунок*** 5А). Это означает, что конфигурация петли α13-α14 стабильна. Для рАХЭ наблюдались два близких макросостояния без значительного различия в формировании контактов с петлей от второго мономера.

Для БХЭ локализуется 4 макросостояния петли, различающихся принципиально по области контакта (***Рисунок*** 5 Б-Д). Состояние, выделенное красным цветом, является наименее благоприятным для димеризации, оно стабилизируется взаимодействием между Arg381 и Asp378 (это отчасти объясняет, почему аланин более предпочтителен, чем Asp378), а наиболее выгодное для димеризации состояние, помеченное жёлтым цветом, стабилизируется водородной связью между Trp376 и Gln380. В промежуточных состояниях происходит перераспределение водородных связей.

Свободная энергия димеризации была рассчитана молекулярно-динамически по методу зонтичной выборки с обменом гамильтонианами. $\Delta G°_{димеризации}$ составила -26.4 ккал/моль для чАХЭ и -15.5 ккал/моль для БХЭ, что косвенно согласуется с наличием в кристаллографических структурах двух типов БХЭ – имеющего канонический димер и не имеющего. В молекулярно-динамических траекториях процесса диссоциации димера чАХЭ спирали в основном оставались антипараллельными, сохраняя гидрофобные контакты как можно дольше. Для БХЭ наблюдается противоположная ситуация, то есть гидрофобные контакты между петлями теряются в начале процесса диссоциации, в то время как π-π и π-катионные контакты в середине спиралей сохраняются дольше.

Особенности строения димера нейролигина 3 были описаны теми же методами, что и димеров холинэстераз. Недавно полученная и пока неопубликованная кристаллографическая структура нейролигина 3 по геометрическим критериям соответствует димеру из четырёх альфа-спиралей. Изменение площади гидрофобных контактов оказывается средним в наборе исследуемых белков и в ходе МД моделирования меняется незначительно.

Нейролигин 3 не имеет солевых мостиков между спиралями, образующими контакт, однако ионные пары присутствуют на петлях и оказываются достаточно устойчивыми в ходе МД моделирования (присутствуют на 90% кадрах траектории).

Как и в случае холинэстераз, нахождение гидрофильных остатков в пространстве между спиралями снижает стабильность димера. За счёт присутствия на отдалённых от регионов контакта частей белка аминокислоты аргинина с длинной углеводородной цепью, замены в этих частях так же уменьшают энергию димеризации.

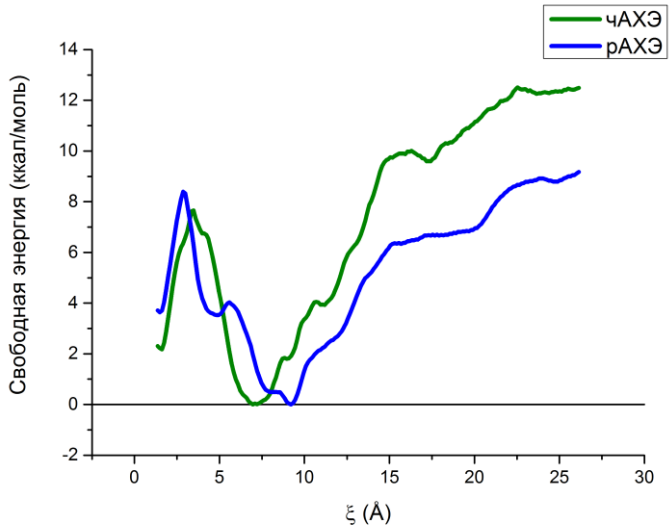
Таким образом, выделены основные особенности строения узла из четырёх альфа-спиралей и типы взаимодействий, его стабилизирующих:

1) между альфа спиралями должны быть прочные гидрофобные взаимодействия, попадание молекул воды в эту часть области контакта дестабилизирует димер;

2) Электростатическое взаимодействие между петлями является необходимым для стабилизации димера, таким образом, от стабильности благоприятной конформации петли и силы электростатического взаимодействия зависит стабильность димера белка.

В **<u>главе 4</u>** описывается выбор методик расчёта и полученные результаты для исследования взаимодействия ривастигмина с ацетилхолинэстеразами *Torpeda californica* и *Homo sapience*.

Расчёт **профиля свободной энергии** (***Рисунок*** 6) перемещения ривастигмина по каналам ацетилхолинэстераз рыбы и человека был проведён методом зонтичной выборки с обменом гамильтонианами. В роли коллективной переменной было выбрано расстояние от карбамильной группы ривастигмина до серина активного центра фермента.



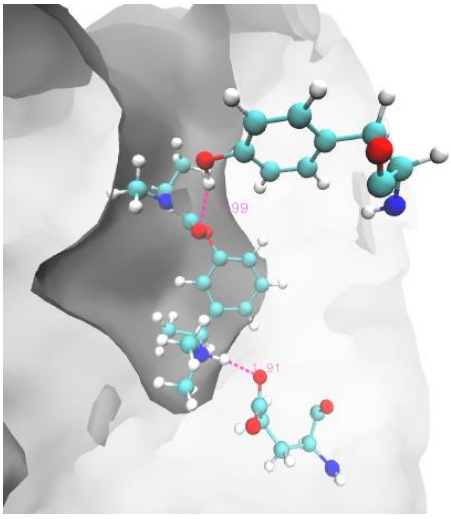


Рисунок 6 Профиль свободной энергии перемещения ривастигмина по каналу и наиболее энергетически выгодное расположение ривастигмина в канале рАХЭ (аналогично таковому у хАХЭ)

Для обеих ацетилхолинэстераз наблюдается образование фермент-субстратного комплекса в положении ривастигмина, при котором карбамильный атом кислорода образует водородную связь с Tyr124 (здесь и далее нумерация аминокислот по чАХЭ), а положительно заряженная часть субстрата стабилизируется Glu202 (***Рисунок*** 6). При нахождении ривастигмина в этой области канала нуклеофильная атака невозможна, для перехода субстрата в реакционноспособное положение необходимо преодолеть энергетический барьер 8 ккал/моль для рАХЭ и 9 ккал/моль для чАХЭ. При этом для обеих ацетилхолинэстераз нахождение в области активного сайта энергетически менее выгодно, чем связывание на поверхности канала (ΔG(рАХЭ)=3 ккал/моль, ΔG(чАХЭ)=7 ккал/моль). Полученные при моделировании профили свободной энергии данные позволяют сделать вывод о том, что для АХЭ обоих видов наибольшую сложность представляет проникновение субстрата к активному сайту с разворотом объёмной молекулы ривастигмина в ограниченном пространстве активного сайта и разрыв водородных связей, стабилизирующих неподходящие для нуклеофильной атаки положения субстрата в канале. При этом продуктивный фермент-субстратный комплекс стабильнее для комплекса ривастигмин-чАХЭ.

На рисунке 7 изображён энергетический профиль стадии карбамилирования чАХЭ и конфигурации стационарных точек: фермент-субстратного комплекса (ФС), тетраэдрического интермедиата (ТИ) и карбамоилфермент (КФ).

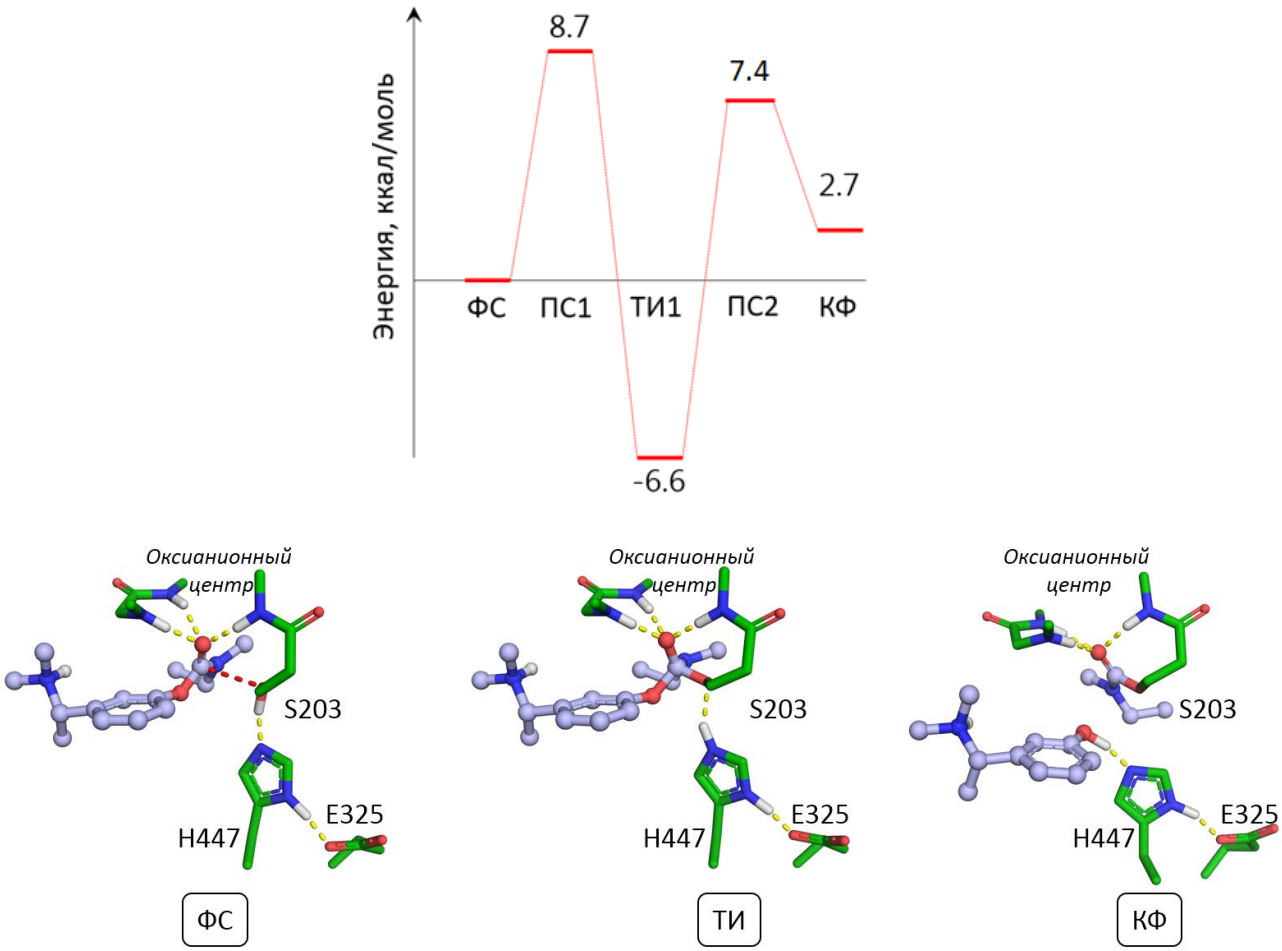


Рисунок 7. Энергетический профиль стадии карбамилирования реакции гидролиза ривастигмина чАХЭ и конфигурации стационарных точек.

В исходном фермент-субстратном комплексе положение ривастигмина стабилизировано оксианионным центром (Glu121, Glu122, Ala204) в наиболее выгодном для нуклеофильной атаки положении посредством образования водородных связей между пептидными группами остатков и карбамильным кислородом. Расстояние нуклеофильной атаки 2,7 Å. В результате нуклеофильной атаки образуется ковалентная связь между карбаматным атомом углерода ривастигмина и Oγ атомом каталитического серина, что сопровождается передачей протона с Ser203 на His447. При этом His447 разворачивается в сторону ривастигмина. Дальнейший перенос протона с каталитического гистидина на фенольный атом кислорода ривастигмина приводит к разрушению тетраэдрического интермедиата и завершению стадии карбамилирования. Образование КФ затруднено из-за того, что объёмная уходящая группа ((-)-S-3-[1-(диметиламино)этил]фенол, NAP) ограничена Trp86. Ω-петля, несущая этот аминокислотный остаток, сама по себе довольно подвижна, однако её динамика не учитывается при моделировании методом КМ/ММ, из-за чего барьер этой стадии по всей видимости сильно завышен. Более адекватное моделирование этого процесса может быть проведено с использованием комбинированных квантово-

механических и молекулярно-динамических методов, но они существенно более затратны с вычислительной точки зрения. Поскольку экспериментально известны кинетические параметры и кристаллографическая структура аддукта, их применение в данном случае не оправдано. Кристаллографическая структура КФ рАХЭ (PDB ID 1GQR), показывает, что после разрыва C-O связи и переноса протона с гистидина на кислород NAP разворачивается в активном центре, для образования ионных взаимодействий заряженной третичной аминогруппы с Glu202(199) и π-катионных взаимодействий с Trp86(84) При этом происходят небольшие изменения в конформациях близлежащих аминокислотных остатков.

Таким образом, ингибирование ривастигмином ацетилхолинэстеразы описывается следующей схемой:

$$E + S \overset{Ks}{\rightleftharpoons} X_1 \overset{K_1}{\rightleftharpoons} X_2 \overset{k_2}{\longrightarrow} E' + P \overset{K_2}{\rightleftharpoons} X_3$$

Рисунок 8. Кинетическая схема ингибирования АХЭ ривастигмином.

За образованием непродуктивного фермент-ингибиторного комплекса следует термодинамически невыгодная трансформация, за ней следует реакция ковалентного ингибирования, которая завершается реориентацией продукта в активном сайте. Поскольку последняя стадия термодинамически не выгодна, она не влияет на константу диссоциации фермент-ингибиторного комплекса K_s, а приводит к уменьшению наблюдаемой каталитической константы скорости реакции ингибирования.

Учитывая, что реориентация ривастигмина в канале для занятия реакционноспособного положения характеризуется достаточно высоким энергетическим барьером, реориентация NAP в активном сайте также должна быть затруднена, и весь процесс распада тетраэдрического интермедиата с образованием карбамоилфермента является лимитирующим в реакции ингибирования.

Сопоставляя разницу в свободной энергии связывания ривастигмина для рАХЭ и чАХЭ, рассчитанную из экспериментальных данных в предположении, что различия есть только в величинах K_s (4,4 ккал/моль), и разницу по расчётам профиля свободной энергии связывания (3,5 ккал/моль) можно сделать вывод, что вклад последующей реакции в эти различия действительно не велик. Таким образом, более быстрое ингибирование чАХЭ ривастигмином по сравнению с рАХЭ связано в первую очередь с большей стабилизацией фермент-ингибиторного комплекса ривастигмин-чАХЭ в канале фермента.

В реакции реактивации оптимизация структуры КФ чАХЭ с соответствующим положением NAP приводит к стабилизации всей системы на 35 ккал/моль, что соответствует образованию энергетических выгодных взаимодействий NAP, конформационных изменений близлежащих аминокислотных остатков и перестройке в водной оболочке. Поэтому энергетический профиль следующей стадии, декарбамилирования, принадлежит другой ППЭ и приводится отдельно (Рисунок 9, А). В этом случае уходящая группа выступает как нековалентный ингибитор. То, что уходящая группа была обнаружена в кристаллографической структуре свидетельствует о том, что её выход из активного сайта затруднён. Находясь в этом положении NAP препятствует доступу молекул воды, необходимых для гидролиза КФ в активный сайт. Хотя в кристаллографической структуре в этой области не была разрешена ни одна молекулы воды, необходимо учитывать, что кристаллические структуры как правило получают в дегидратирующих условиях. Конфигурация ФС комплекса показывает, что в активном сайте на всем протяжении реакции есть место для молекулы воды, связанной с Glu202, которая может гидролизовать КФ.

Скоростьлимитирующей стадией этой реакции является образование ТИ. Высокий барьер 18.8 ккал/моль объясняет известную из литературы экспериментальную крайне низкую скорость этой стадии (26% за 48 часов). При этом ТИ менее стабилен, чем КФ, что в целом нехарактерно для холинэстераз. Помимо электронного сопряжения в карбаматной системе, для которой невыгодно образование ТИ с потерей планарности, основной причиной этого является положение заряженной третичной аминогруппы NAP рядом с каталитическим гистидином, который в ходе образования ТИ принимает протон и становится имидазольным катионом (***Рисунок*** 9, Б). Наличие рядом положительно заряженной группы затрудняет этот процесс, за счёт электростатических эффектов, что объясняет, почему энергетический барьер образования ТИ стадии декарбамилирования значительно выше, чем стадии карбамилирования. Реакция завершается распадом второго тетраэдрического интермедиата и образованием второго продукта — производного карбаминовой кислоты и свободного фермента.

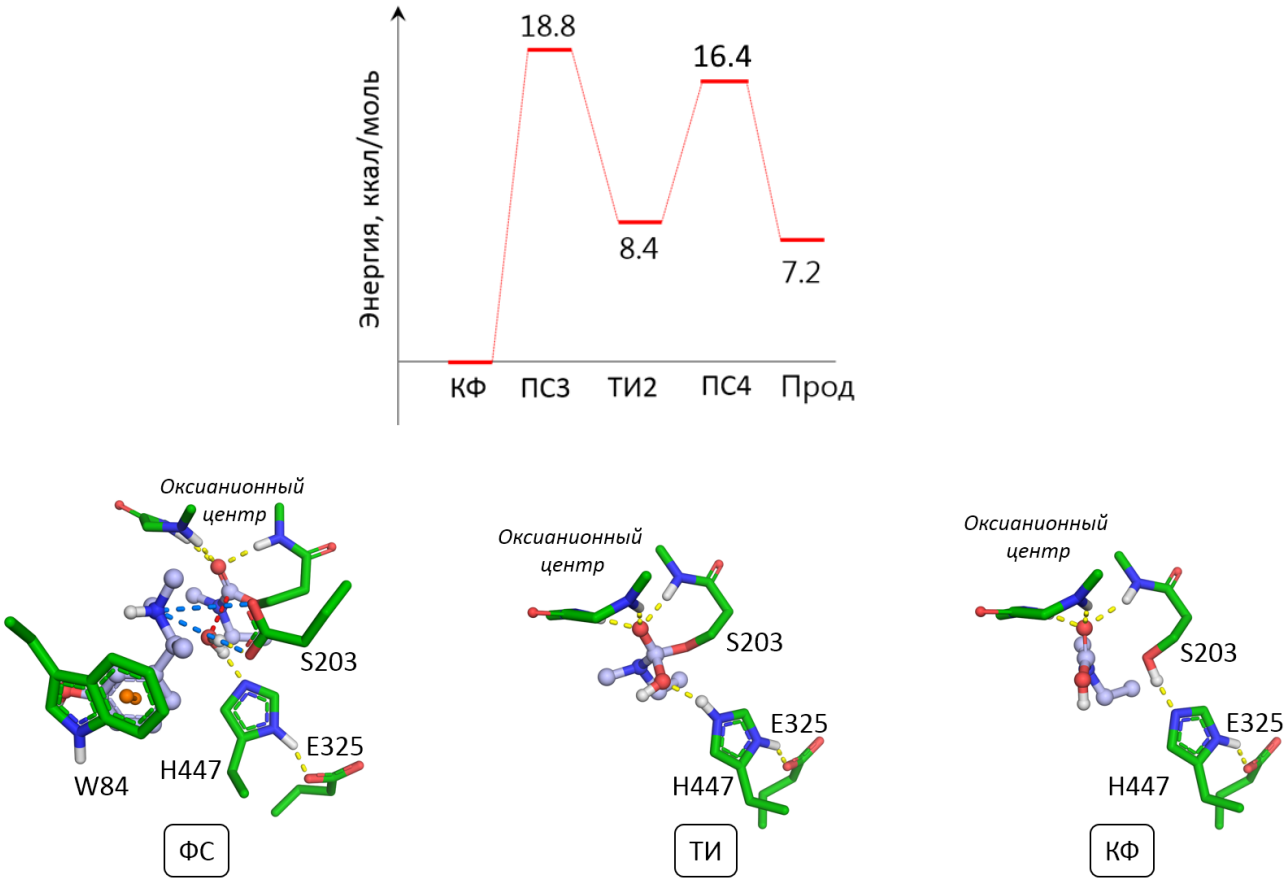


Рисунок 9. Энергетический профиль стадии декарбамилирования реакции гидролиза ривастигмина чАХЭ и конфигурации стационарных точек.

Таким образом, на кинетику взаимодействия ривастигмина с рАХЭ и чАХЭ влияет общая подвижность белковых молекул и аминокислотная замена в канале Tyr337 (Phe330), влияющая на сеть водородных связей и положение ароматических остатков в области активного сайта. Низкая скорость стадии декарбамилирования определяется электронным строением карбамоилфермента и электростатическим влиянием уходящей группы стадии карбамилирования.

Исследование влияния точечных мутаций на структурно-динамические свойства каталитического центра фермента на примере БХЭ человека произведено в **главе 5.** Был разработан мутант человеческой бутирилхолинэстеразы с двойной заменой Asn322Glu/Glu325Gly, затрагивающей каталитическую триаду. Каталитическая триада фермента дикого типа (Ser198·His438·Glu325) была заменена на Ser198·His438·**Glu322**. Существует экспериментальное подтверждение того, что этот мутант сохраняет каталитическую активность. Выбор мутаций основан на предшествующих исследованиях механизма взаимодействия БХЭ с фосфорорганическими соединениями, в частности, эхотиофатом. Для данного фермента было проведено молекулярно-динамическое моделирование, были получены траектории длиной 500 нс для каждой из трёх выбранных

комбинаций протонированных форм ионогенных аминокислот каталитического центра: ($Glu197^{-1}/Glu441^{-1}$), ($Glu197^{0}/Glu441^{-1}$), ($Glu197^{-1}/Glu441^{0}$). Проведён анализ траекторий по модели цепей Маркова, локализовано 6 макросостояний для каждой траектории.

Для системы с протонированным Glu197 из-за смещения His438 каталитическая триада неактивна в двух макросостояниях, но активна в четырёх остальных. Макросостояния отвечают формированию различных сетей водородных связей, в частности, в некоторых макросостояниях $Glu197^{0}$ образует водородную связь с $Glu441^{-1}$, что говорит о возможности переноса протона на Glu441.

В системе с протонированным Glu441 все локализованные макросостояния содержат активную каталитическую триаду, остальные аминокислотные остатки, участвующие в её стабилизации, образуют различные сети водородных связей.

Система с депротонированными остатками глутаминовой кислоты по своим структурно-динамическим свойствам схожа с системой, где протонирован только Glu197, тогда как система с протонированным Glu441 претерпевает конформационные изменения. Таким образом можно предположить, что равновесие:

$$(Glu197^{-1}/Glu441^{-1}) \leftrightarrow (Glu197^{0}/Glu441^{-1}) \rightarrow (Glu197^{-1}/Glu441^{0})$$

Сдвинуто в сторону образования формы с протонированным Glu441, что способствует стабилизации каталитической триады в активном состоянии и позволяет предположить, что данный мутант будет активен в процессе самореактивации, что подтверждается экспериментальными данными. Таким образом, данные точечные мутации можно использовать в дальнейшем как базу для создания новых, более эффективных мутантов.

Выводы

1. По результатам анализа факторов, влияющих на стабильность межбелковых контактов в виде узла из четырёх альфа спиралей на примере димеров холинэстераз и нейролигина 3 показано, что статическая оценка количества стабилизирующих и дестабилизирующих аминокислотных взаимодействий недостаточна для количественного описания энергии димеризации. Разработана методика комплексной оценки структурно-динамических свойств белков и энергии димеризации.
2. На основании проведённого анализа кинетики димеризации холинэстераз и нейролигина 3 показано, что для формирования узла из четырёх альфа спиралей необходимы гидрофобные взаимодействия между спиралями в области контакта, стабильность петель в районе контакта и возможность электростатического взаимодействия между петлями.
3. Показано, что контакт в димере БХЭ менее стабилен, чем в чАХЭ за счёт большей подвижности петли в регионе связывания и меньшей гидрофобности поверхности контакта.
4. Описана кинетика образования предреакционного фермент-ингибиторного комплекса. Показано, что лимитирующей стадией является реориентация ингибитора в ограниченном пространстве активного сайта для занятия реакционноспособного положения, и разрыв водородных связей, стабилизирующих непродуктивное положение.
5. Описан каталитический механизм медленного гидролиза ривастигмина ацетилхолинэстеразой. Показано, что низкая скорость стадии декарбамилирования определяется строением карбамоилфермента и электростатическим влиянием уходящей группы стадии карбамилирования.
6. Проведено сравнение кинетики связывания ингибитора с ферментом для АХЭ человека и рыбы. Показано, что более быстрое ингибирование чАХЭ ривастигмином по сравнению с рАХЭ связано с большей стабилизацией фермент-ингибиторного комплекса ривастигмин-чАХЭ.
7. Показано, что мутант Asn322Glu/Glu325Gly БХЭ с заменой в каталитической триаде имеет несколько мета-стабильных конформаций и сохраняет каталитическую активность за счёт преобладания формы с активной каталитической триадой.

Список публикаций по теме работы

Список статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus:

1. **Novichkova D. A.**, Lushchekina S. V., Dym O., Masson P., Silman I., Sussman J. L. The four-helix bundle in cholinesterase dimers: structural and energetic determinants of stability // Chemico-Biological Interactions. – 2019. – V.309. – P. 108699. [Импакт-фактор WoS= 3.407]
2. Grigorenko B. L., **Novichkova D. A.**, Lushchekina S. V., Zueva I. V., Schopfer L. M., Nemukhin A. V., Varfolomeev S. D., Lockridge O., Masson P. Computer-designed active human butyrylcholinesterase double mutant with a new catalytic triad // Chemico-Biological Interactions. – 2019. – V.309. – P. 138-146. [Импакт-фактор WoS= 3.407]
3. Lushchekina S. V., Makhaeva G. F., **Novichkova D. A.**, Zueva I. V., Kovaleva N. V., Richardson R. J. Supercomputer modeling of dual-site acetylcholinesterase (AChE) inhibition // Supercomputing Frontiers and Innovations. – 2018. – V.5(4). –P. 89-97. [Импакт фактор Scopus CiteScore=0.93]
4. Lushchekina S. V., Kots E. D., **Novichkova D. A.**, Petrov K. A., Masson P. Role of Acetylcholinesterase in β-Amyloid Aggregation Studied by Accelerated Molecular Dynamics // BioNanoScience. – 2017. – V.7(2). –P. 396-402. [Импакт фактор Scopus CiteScore =1.00]

Глава в сборнике:

1. Немухин А.В., Григоренко Б.Л., Лущекина С.В., Поломских В.С., **Новичкова Д.А.**, Варфоломеев С.Д. «Квантово-химическое моделирование в исследовании молекулярных механизмов действия ферментов», стр. 141-188 в кн. «Физическая химия биопроцессов» под ред. С.Д. Варфоломеева, Москва:УРСС, 2014, 800с. ISBN 978-5-396-00585-3.

Список публикаций в сборниках материалов и тезисов конференций:

1. **Новичкова Д. А.**, Лущекина С. В. Молекулярное моделирование кинетики связывания ривастигмина ацетилхолинэстеразами рыбы и человека // XXXVI Всероссийский симпозиум молодых ученых по химической кинетике. Сборник трудов. Под редакцией Мельникова М.Я., Верной О.И. – Москва, 2019. – С. 135.
2. **Новичкова Д. А.**, Лущекина С. В., Немухин А.В. Физико-химические факторы, определяющие формирование и стабильность димеров холинэстераз // Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни». Материалы международного конгресса, выпуск 17 – Москва, 2019. – С.484.

3. **Novichkova D. A.**, Lushchekina S. V., Sussman, J. L. Dimerization interface of cholinesterases: analysis of crystal structures, free energy molecular dynamics calculations, and in silico alanine screening // Mil. Med. Sci. Lett. (Voj. Zdrav. Listy) – 2018. – V.87. –P.82
4. **Новичкова Д. А.**, Лущекина С. В. Различие в строении ацетилхолинэстераз различных видов и влияние его на кинетику взаимодействия с ингибиторами. // Сборник Биохимическая физика Труды XVI Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы. – Москва, 2017. –С. 162-163.
5. **Новичкова Д. А.** Применение методов компьютерного моделирования для оценки различий в структуре и свойствах холинэстераз различных видов // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2015», секция Химия. Отв. ред. А.И. Андреев, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. – Электронный ресурс. – Москва, 2015.
6. **Новичкова Д. А.**, Лущекина С. В., Немухин А. В. Межбелковые взаимодействия при формировании узла из четырёх а-спиралей на примере холинэстераз и нейролигинов // Сборник Биохимическая физика Труды XIV Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы. – Москва, 2014. –С. 152-155
7. **Новичкова Д. А.** Транспорт ацетилхолина в АХЭ различных видов. Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2014», секция Химия. Отв. ред. А.И. Андреев, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. – Электронный ресурс. – Москва, 2014.
8. Lushchekina S., Gubaydullina A., Polomskih V., **Novichkova D**., Nemukhin A., Masson P., and Varfolomeev S. QM/MM of ChE-catalyzed reactions with special attention to OP inhibition // The FEBS Journal . – 2013. – V.280(S1). –P. 164.
9. **Novichkova D. A.**, Lushchekina S. V., Masson P., Nemukhin A. V., Varfolomeev S. D. Computational study of the cholinesterase dynamics // Thesis of 11th International Meeting on Cholinesterases. – Казань, 2012. –С. 140
10. Поломских В. С., **Новичкова Д. А.**, Лущекина С. В., Немухин А. В. Анализ кристаллографических данных структур ацетилхолинэстераз как один из этапов компьютерного моделирования // Сборник Биохимическая физика Труды XI Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы. – Москва, 2011. –С. 207-211.