

ИНСТИТУТ БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ
имени Н.М. ЭМАНУЭЛЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



Новичкова Дана Александровна

**Молекулярное моделирование структурно-динамических и
каталитических характеристик холинэстераз различных типов**

02.00.15 – кинетика и катализ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата физико-математических наук

Москва-2020

Оглавление

Оглавление	2
Введение	4
Глава 1. Холинэстеразы – группа гидролаз различных видов, имеющих разнообразные формы и функции. Литературные данные	11
1.1. Биологические функции холинэстераз.....	11
1.2. Медицинское значение холинэстераз.....	12
1.3. Структура холинэстераз различных видов: общее и различия.....	13
1.4. Типы четвертичных структур холинэстераз.....	15
1.5. Многообразие кристаллических структур холинэстераз	17
1.6. Электростатические характеристики холинэстераз.....	18
1.7. Механизм взаимодействия бутирилхолинэстеразы с ФОС	20
Глава 2. Узел из четырёх альфа спиралей – распространённый мотив четвертичной структуры. Литературные данные.....	23
2.1. Геометрические аспекты формирования узла из четырёх альфа спиралей	23
2.2. Типы взаимодействия между субъединицами, формирующими узел из четырёх альфа спиралей	25
2.3. Нейролигины – белки, образующие четвертичную структуру при помощи узла из четырёх альфа-спиралей.....	26
Глава 3. Формирование узла из четырёх альфа спиралей в холинэстеразах и нейролигине 3	31
3.1. Молекулярная динамика и анализ траектории.....	31
3.2. Геометрические аспекты формирования узла из четырёх альфа-спиралей: кристаллографические структуры и молекулярная динамика	32
3.3. Оценка аполярных взаимодействий.	33
3.4. Полярная энергия связывания.....	36

3.5. <i>In silico</i> аланиновый скрининг	46
3.6. Роль конформационных изменений при образовании узла из четырёх альфа спиралей	55
3.7. Комбинированный метод зонтичной выборки и алгоритма перекрещивающихся распределений для расчёта энергии димеризации	63
3.8. Влияние гликозилирования на формирование четвертичной структуры бутирилхолинэстеразы.....	65
3.9. Особенности строения димера нейролигина 3	70
Глава 4. Особенности взаимодействия холинэстераз с ривастигмином в зависимости от исходной структуры белка: влияние различий между холинэстеразами различных видов и конформационных изменений	75
4.1. Механизм взаимодействия АХЭ с фенилметилсульфонилфторидом: экспериментальные данные и молекулярная динамика	75
4.2. Механизм взаимодействия АХЭ с ривастигмином	77
4.3. Докинг молекулы ривастигмина в активный сайт ацетилхолинэстераз <i>Torpedo californica</i> и <i>Homo sapience</i>	79
4.4. Перемещение ривастигмина по каналу ацетилхолинэстеразы <i>Torpedo californica</i> и <i>Homo sapience</i>	82
4.5. Моделирование реакции гидролиза ривастигмина методом КМ/ММ ...	85
Глава 5. Влияние точечных мутаций на структурно-динамические свойства каталитического центра фермента на примере БХЭ <i>Homo sapience</i>	93
5.1. Поиск вариантов БХЭ – каталитических органофосфатгидролаз.....	93
5.2 Молекулярная динамика вариантов бутирилхолинэстеразы.....	95
5.3. Анализ конформационных изменений по методу Маркова.....	96
Выводы	101
Список литературы.....	104

Введение

Актуальность темы. Изучение структурно-динамических свойств белков представляет большой интерес как с фундаментальной [1], так и с прикладной [2] точки зрения. Специфичность [3, 4], аллостерическая модуляция [5, 6], кооперативное взаимодействие [7], видовые различия [8] 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 [9-12], 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 белок центральной нервной системы [13], используется в качестве мишени при терапии нейродегенеративных заболеваний, бутирилхолинэстераза – фермент, физиологическая функция которого до конца не ясна, но который способен связывать ряд ксенобиотиков, включая нейропаралитические яды [14]. 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 [15] и является одним из критериев успешности биосинтеза [16].

Сравнение структуры, динамики и реакционной способности одного фермента из различных организмов на примере ацетилхолинэстераз *Homo sapiens*

и *Torpedo californica* является актуальной задачей, позволяя оценить возможность использования помимо ацетилхолинэстеразы *Homo sapiens* 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 каталитическом центре.

Нативная бутирилхолинэстераза *Homo sapiens* 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 количества белка, что сильно повышает стоимость такой терапии. Создание мутантов бутирилхолинэстеразы, способных к спонтанной реактивации, т.е. каталитическому расщеплению ФОС, является важной биомедицинской задачей [17]. 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 к 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 [18-21] (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 [22]. Экспрессированы и охарактеризованы мутанты бутирилхолинэстеразы, самореактивирующиеся после ингибирования фосфорорганическими соединениями, однако имеющие недостаточно высокие скорости гидролиза ФОС для практического применения [23]. Опубликован ряд работ по молекулярному моделированию взаимодействия холинэстераз и ФОС, в том числе, предлагающих принципы создания новых мутантов, способных к спонтанной реактивации [24].

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 *Homo sapience* и *Torpedo californica*;
3. Исследование каталитического механизма медленного гидролиза ривастигмина АХЭ *Homo sapience* и *Torpedo californica*;
4. Исследование влияния точечных мутаций на структурно-динамические свойства и стабильность активного центра фермента на примере БХЭ *Homo sapience*.

Объект и предмет исследования

В качестве модельных объектов выбраны молекулярные структуры ацетилхолинэстеразы различных видов: *Homo sapience* (чАХЭ), *Mus musculus* (мАХЭ), *Torpedo californica* (рАХЭ), *Drosophila melanogaster* (дАХЭ) (КФ 3.1.1.7), бутирилхолинэстеразы *Homo sapience* (БХЭ, КФ 3.1.1.8) 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. Молекулярная динамика по методу зонтичной выборки с обменом гамильтонианами применялась для расчёта профиля свободной энергии димеризации белков и перемещения ингибитора по каналу белка к активному сайту. Для оценки нековалентного связывания мономеров белков аминокислотных остатков интерфейсов димеризации 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 спиральями 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 *Homo sapiens*, за счёт большей подвижности петли в регионе связывания и меньшей гидрофобности поверхности контакта.
4. При взаимодействии ацетилхолинэстераз *Torpedo californica* и *Homo sapiens* с ривастигмином лимитирующей стадией образования предреакционного фермент-ингибиторного комплекса является реориентация ингибитора в ограниченном пространстве активного сайта 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. 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.

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 ежегодной молодежной конференции с между народным участием ИБХФ РАН-ВУЗы

«Биохимическая физика» (Москва 2011, 2014, 2016), 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, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и RSCI, 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»).

Глава 1. Холинэстеразы – группа гидролаз различных видов, имеющих разнообразные формы и функции. Литературные данные

Холинэстеразы относятся к классу гидролаз и в основном реагируют с эфирами холина. К группе холинэстераз относятся ферменты подгруппы ацетилхолинэстераз и подгруппы, разделение на группы происходит на основе субстратной специфичности. Ацетилхолинэстеразы гидролизуют ацетилхолин быстрее, чем остальные эфиры холина, и проявляют небольшую активность по отношению к бутирилхолину. Бутирилхолинэстеразы в свою очередь гидролизуют бутирилхолин быстрее, чем ацетилхолин. Однако бутирилхолинэстеразы малоспецифичны и гидролизуют также ацетилхолин и другие эфиры холина. [25]

1.1. Биологические функции холинэстераз

Холинэстеразы обоих подтипов обнаруживаются в некоторых растительных и в большинстве животных клеток [26, 27], играя различные роли.

Основная роль ацетилхолинэстеразы в организме млекопитающих – быстрый гидролиз нейромедиатора ацетилхолина в холинэргических синапсах центральной нервной системы и мышечных клетках [28], однако существует и ряд неклассических функций ацетилхолинэстеразы (влияние на рост аксонов и формирование синапсов, эмбриональное развитие, возможно, кроветворная активность у позвоночных [29]).

В отличие от ацетилхолинэстеразы, функция бутирилхолинэстеразы в организме млекопитающих до сих пор до конца не ясна. Бутирилхолинэстераза может гидролизовать ацетилхолин, как и ацетилхолинэстераза, а также большой спектр других соединений, как физиологических, так и ксенобиотиков. БХЭ может расщеплять большое число соединений, содержащих сложноэфирную, амидную, пептидную связи, играет важную фармакологическую и токсикологическую роль. Среди субстратов бутирилхолинэстеразы миорелаксант сукцинилхолин [30], наркотическое вещество кокаин [31], «гормон голода» грелин [32]. Обнаружена связь активности БХЭ и вероятности возникновения преэклампсии и реакции на оксидативный стресс [33].

Вездесущность холинэстераз в филогении указывает на чрезвычайно раннее происхождение этого фермента в эволюционном процессе. У растений основной субстрат холинэстераз ацетилхолин участвует в регуляции всасывании воды и фотосинтеза [34] и в совместимости при размножении [35].

1.2. Медицинское значение холинэстераз

Холинэстеразы являются мишенями для лекарственной терапии различных заболеваний. В случае терапии болезни Альцгеймера наиболее изучено симптоматическое действие ингибиторов холинэстераз [36]. За счёт ингибирования АХЭ увеличивается концентрация ацетилхолина в синапсе и влияние его на рецептор продлевается, позволяя на некоторое время преодолеть дефицит холинэргических нейронов. В мозге здоровых людей преобладает АХЭ, однако есть данные, что при развитии болезни Альцгеймера увеличивается содержание БХЭ, также гидролизующей ацетилхолин, следовательно, для увеличения влияния ингибиторов АХЭ на концентрацию ацетилхолина имеет смысл использовать препараты, ингибирующие как АХЭ, так и БХЭ. Например, к таким относится коммерческий препарат ривастигмин [37].

Продemonстрировано, что холинэстеразы могут ускорить образование и агрегацию фибрилл А β и еще больше повысить их нейротоксичность [38]. Следовательно, на основе ингибиторов ассоциации холинэстераз и фибрилл А β имеются хорошие перспективы разработки лекарств, не только симптоматических, но и тормозящих прогрессирование самого заболевания.

Снижение плотности ацетилхолиновых рецепторов также является одной из причин миастенического синдрома, таким образом, ингибирование ацетилхолинэстеразы для увеличения концентрации ацетилхолина может иметь терапевтическое значение в лечении этого заболевания.

Бутирилхолинэстераза играет большую роль в фармакокинетике, расщепляя лекарственные средства, например, аспирин [39]. Также БХЭ в плазме крови обратимо связывает антидепрессанты [40], участвует в гидролизе кокаина [41], на данный момент ведутся разработки мутантов БХЭ, более эффективно гидролизующих оба изомера кокаина [42].

Также бутирилхолинэстераза – стехиометрическая биоловушка для фосфоорганических отравляющих веществ, таких как пестициды, боевые химические отравляющие вещества VX, зарин, зоман, табун [43] и их производных [44]. На данный момент в качестве терапии отравлений ФОС применяют инъекции рекомбинантной БХЭ [45], а также идёт разработка мутанта БХЭ, способного к каталитическому расщеплению ФОС [24].

1.3. Структура холинэстераз различных видов: общее и различия

Независимо от источника, холинэстеразы имеют схожее строение.

Каталитические домены этих ферментов организованы как глобулы, состоящие из таких элементов вторичной структуры, как α -спирали и β -листы (α/β фолдинг) [46], аналогичную структуру имеют другие эстеразы и некоторые некаталитические белки, такие как глутактин *Drosophila melanogaster*, нейротактин и нейролигины млекопитающих.

Активный центр находится в центре белка на дне длинного (20Å длиной) канала. Аминокислоты, устилающие канал, варьируются в зависимости от типа фермента.

Около середины канала присутствует узкое место, называемое «бутылочное горлышко». Оно образовано двумя ароматическими остатками, расстояние между ними меньше, чем размер четвертичной группы ацетилхолина. Важным различием между рАХЭ и чАХЭ является строение «бутылочного горлышка». В случае рАХЭ оно образовано двумя фенилаланином и тирозином (Y121 и F330) и имеет радиус ~5 Å. В ацетилхолинэстеразе *Homo sapiens* и других млекопитающих фенилаланин заменён на тирозин (F330 на Y337), что приводит к уменьшению размера бутылочного горлышка до 2.4 Å.

Необходимыми компонентами активного центра являются:

1. каталитическая триада (Ser203, His447, Glu334) (здесь и далее – нумерация по чАХЭ, если не оговорено иначе) непосредственно участвует в гидролизе субстратов. Серин участвует в нуклеофильной атаке субстрата, гистидин является кислотно-основным элементом

2. оксианионный центр (Glu121, Glu122, Ala204) фиксирует субстрат в активном центре фермента в наиболее выгодном для нуклеофильной атаки положении посредством образования водородных связей между пептидными группами остатков и карбонильным кислородом
3. анионный карман (Trp86, Glu202, Tyr337) фиксирует положительно заряженные группы субстратов посредством их электростатического взаимодействия с Glu202 и π -катионного взаимодействия с индольным кольцом Trp86 и бензольным кольцом Tyr337.

Аминокислоты, составляющие активный центр, консервативны в холинэстеразах многих видов, однако есть исключения. Так, в АХЭ круглого червя *Necator americanus* Ala204 и Ser203 переставлены местами. Glu121 и Ala204 консервативны во всех видах, для которых известна аминокислотная последовательность, тогда как Glu122 в некоторых холинэстеразах заменён на серин, аспарагиновую кислоту или аланин. Trp86 консервативен для всех холинэстераз[47].

В регионе активного центра основные различия между холинэстеразами различных видов связаны со строением гидрофобных областей, окружающих активный сайт; с аминокислотами, устилающими канал; со стабильностью третичной структуры, особенно с подвижностью Ω -петли Cys69-Cys96.

Вне региона активного центра возможны большие расхождения в аминокислотной последовательности (Таблица 1) и, как следствие, во вторичной, третичной и четвертичной структурах.

Таблица 1. Процент идентичности последовательностей различных холинэстераз с чАХЭ

Источник и тип холинэстеразы	Процент идентичности последовательностей с чАХЭ
<i>Mus musculus</i> , АХЭ	88
<i>Torpedo californica</i> , АХЭ	52
<i>Gallus gallus</i> , АХЭ	47
<i>Drosophila melanogaster</i> , АХЭ	33
<i>Homo sapiens</i> , БХЭ	49

Геометрические структуры рАХЭ и чАХЭ имеют минимальные различия. Значение ВМНК (взвешенного метода наименьших квадратов) координат атомов S_{α} составляет 0.54 Å для 434 атомов кристаллографических структур. Однако при аккуратном сравнении этих белков выявляются следующие различия:

1. Строение «бутылочного горлышка»
2. В чАХЭ добавлены остатки P258-P259-G260-G261, образующие наиболее подвижный элемент вторичной структуры, петлю. Это приводит к большей подвижности белка и к облегчению открытия «бутылочного горлышка»
3. Четыре остатка в верхней части канала отличаются в структурах рАХЭ и чАХЭ: E73(T75), Q74(L76), S81(T83), S124(A127).

1.4. Типы четвертичных структур холинэстераз

Ген АХЭ может продуцировать несколько типов холинэстераз, отличающихся альтернативным выбором сплайсинга. Этот процесс генерирует каталитические субъединицы, содержащие один и тот же каталитический домен, но связанные с различными С-концевыми пептидами [5, 35]. Различные типы субъединиц АХЭ, которые присутствуют в организме позвоночных, схематично представлены на Рисунок 1.

(1) «Сквозная» (R) является результатом отсутствия сплайсинга помимо экзонов, кодирующих каталитический домен; Полученные каталитические субъединицы, АХЭ_R, остаются растворимыми и мономерными. Они были

обнаружены в эмбриональных тканях и клеточных культурах; АХЭ_R найдены в эритроцитах мыши, но не найдены в эритроцитах человека.

(2) «Гидрофобная» (H) – каталитическая гидрофобная субъединица, АХЭ_H, связанная с гликофосфатидилинозитолом. Эта форма фермента экспрессируется в различных тканях *Torpedo californica* (мышцы, электрический орган); у млекопитающих эта форма в основном присутствует в гематопоетических клетках, где холинэстеразы участвуют в устранении ацетилхолина из кровотока.

(3) «Удлиненная» (T) АХЭ_T и БХЭ_T имеет большое разнообразие олигомерных форм, в том числе гомоолигомеры (мономер, димер и тетрамер), а также гетеромерные ассоциации тетрамеров с коллагеном (ColQ) и богатым пролином мембранным якорем (PRiMA).

(4) «Растворимая» (S) мономерная АХЭ_S образуется в основном в железах, секретирующих яд таких змей, как *Bungarus* и *Naja* [48].

В составе всех олигомеров холинэстеразы находятся в виде димеров, имеющих область контакта по типу узла из четырёх альфа спиралей, поэтому исследование процесса димеризации и особенности димеризации АХЭ и БХЭ представляет интерес для описания биосинтеза холинэстераз, понимания факторов, стабилизирующих холинэстеразы в кровотоке, а также для понимания связи структурных различий между АХЭ и БХЭ с их биологической ролью.

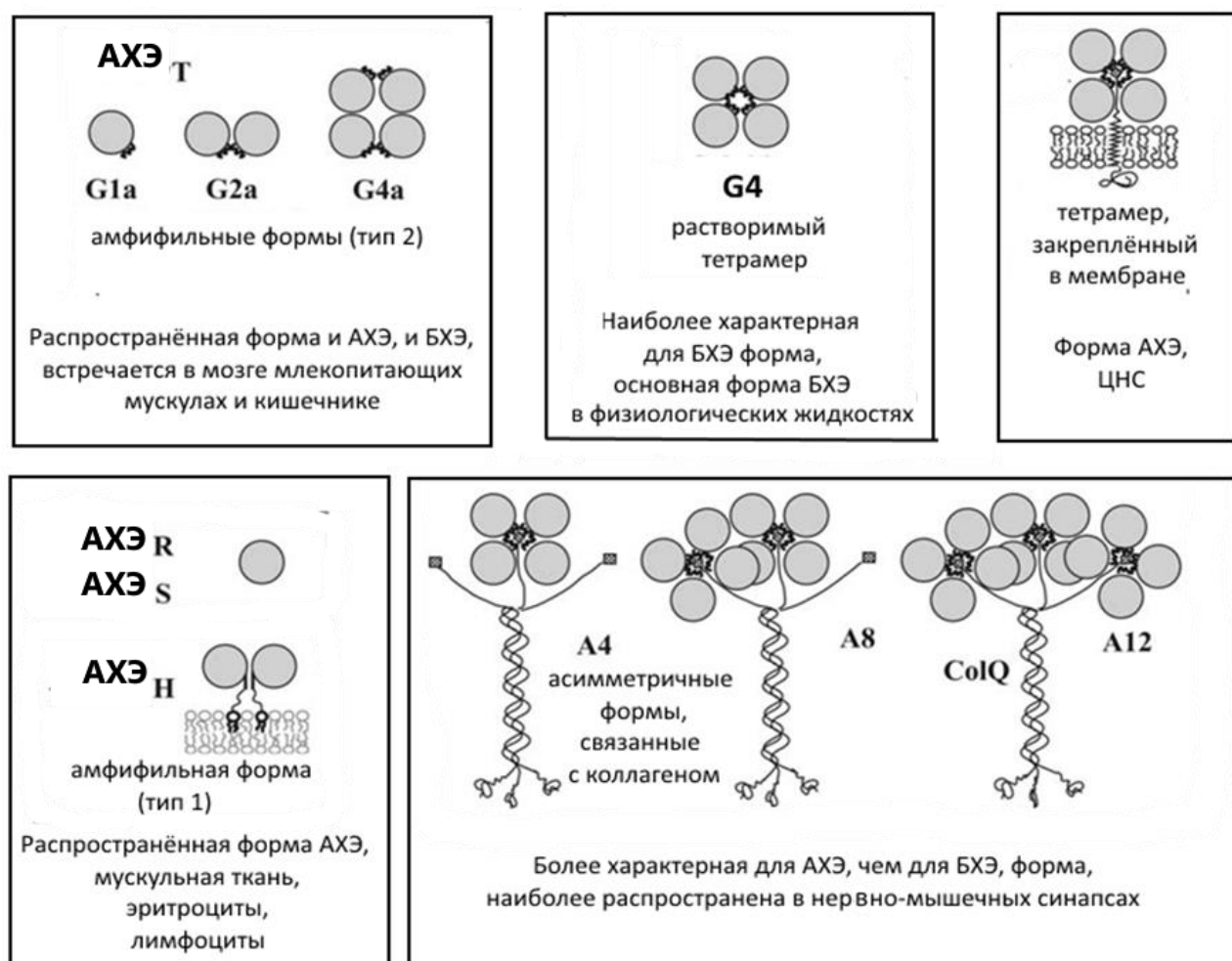


Рисунок 1. Многообразие четвертичных структур холинэстераз и их присутствие в различных тканях.

1.5. Многообразие кристаллических структур холинэстераз

Разрешение трехмерной кристаллической структуры ацетилхолинэстеразы *Torpedo californica* (PDB ID 1ACE) в 1991 году открыло новые горизонты в изучении фермента, который уже был предметом интенсивных исследований [49]. С 1991 года было получено более 230 кристаллографических структур ацетилхолинэстеразы. В 1999 году была получена с низким разрешением структура тетрамера ацетилхолинэстеразы *Electrophorus electricus* (PDB ID 1C2O и 1C2B) [50]. Кристаллографическая структура ацетилхолинэстеразы *Mus musculus* (PDB ID 1MAN) была получена первой среди холинэстераз млекопитающих [51]. В 2001 году была впервые опубликована структура чAXЭ. Как и в случае мAXЭ из-за сложностей с кристаллизацией индивидуальной ацетилхолинэстеразы данный

фермент был кристаллизован и разрешён в комплексе с пептидным ингибитором фасцикулином [21]. Лишь позднее в 2012 году была получена структура чАХЭ, не ингибированная фасцикулином (PDB ID 4EY4) [52]. Также доступны кристаллографические структуры холинэстераз насекомых *Drosophila melanogaster* (впервые получена в 2000 году, PDB ID 1QO9, 1QON, 1DX4 [19]) и *Anopheles gambiae* (впервые получена в 2017 году, PDB ID 5X61 [53]). Исследование этих холинэстераз имеет большое значение для направленного поиска инсектицидов, в частности, для борьбы с распространением малярии.

Структуры ацетилхолинэстераз получены в тринадцати кристаллографических группах симметрии, как для свободных ацетилхолинэстераз, так и для ацетилхолинэстераз, связанных с различными ингибиторами: ковалентными, нековалентными, пептидными, ингибиторами периферического сайта. Независимо от источника, группы симметрии, типа лигандов и способа получения, ацетилхолинэстеразы образуют кристаллографические контакты по типу узла из четырёх альфа спиралей.

1.6. Электростатические характеристики холинэстераз

Скорость перемещения ацетилхолина по каналу должна быть достаточно высокой, чтобы обеспечить эффективный катализ. Существуют свидетельства того, что одной из движущих сил перемещения является градиент заряда вдоль канала. Таким образом, электростатические свойства занимают важное место в характеристике холинэстераз.

Методом электрического дихроизма был измерен дипольный момент ацетилхолинэстеразы *Bungarus fasciatus*. Полученное значение – 1000 дебаев – очень велико для белков [54]. Рассчитанные методом Пуассона-Больцмана условные дипольные моменты холинэстераз различных видов оказываются также около 1000 дебаев [55].

Понятие дипольного момента может быть определено формально только для электрически нейтрального объекта, тогда как молекулы изучаемых белков имеют заряды отличные от нуля. В заряженном виде дипольный момент не является фиксированным внутренним свойством, а зависит от выбора положения

центральной точки. Тем не менее, имеет значение вычисление дипольных моментов даже для заряженных молекул как характеристика меры неоднородности распределения их частичных атомных зарядов. Чтобы отличить такой диполь от истинного дипольного момента, назовем его условным дипольным моментом.

Все холинэстеразы имеют асимметричное распределение зарядов, так, что в области около входа в канал имеется избыток отрицательного заряда относительно дальней стороны фермента (Рисунок 2).

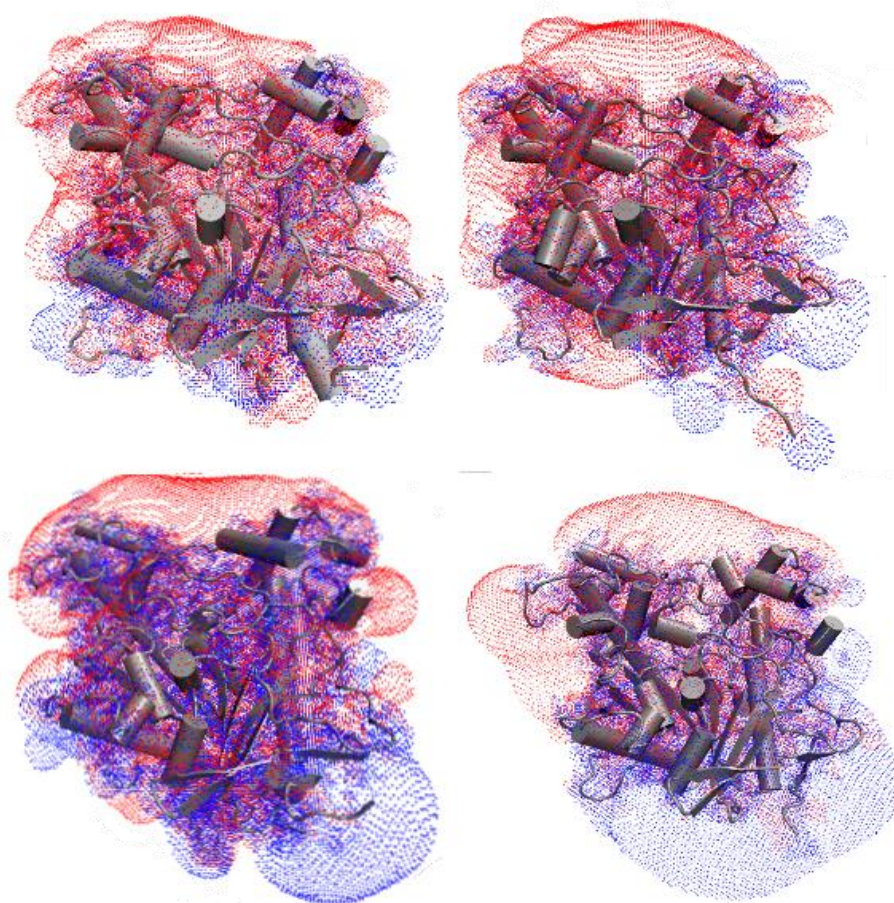


Рисунок 2. Распределение заряда в холинэстеразах различных источников. Слева направо, сверху вниз: ацетилхолинэстераза *Homo sapiens*, *Torpedo californica*, *Drosophila melanogaster*, бутирилхолинэстераза *Homo sapiens*.

Также рассчитано изменение потенциала при продвижении по каналу холинэстераз. Потенциал постепенно уменьшается по мере движения вдоль оси канала и достигает максимума по модулю возле его основания.

Все модели АХЭ демонстрируют одинаковое изменение потенциала: постепенно увеличивающийся по модулю отрицательный в области на расстоянии

$\sim 14\text{--}8 \text{ \AA}$ от начала канала, в зависимости от конкретного вида, потенциалы относительно постоянны, а затем резко падают к дну канала. В случае БХЭ область плато практически отсутствует. Сильнее всего изменяет потенциал рАХЭ (на 13 кТ/Е). Потенциал чАХЭ и мАХЭ снижается на 11,5 кТ/Е, БХЭ на 8 кТ/Е.

1.7. Механизм взаимодействия бутирилхолинэстеразы с ФОС

Необратимое ингибирование АХЭ фосфорорганическими соединениями, такими, как зоман, может привести к смерти. В этом процессе ФОС ковалентно присоединяется к остатку серина в активном сайте, генерируя фосфорилированный фермент.

После стереоселективного образования комплекса фермент-органوفосфат, органوفосфат создает ковалентную связь с каталитическим серином и одновременно высвобождает уходящую группу. В отношении ингибирования ХЭ с помощью ФОС, наиболее вероятным считается механизм с образованием стабильного пента-координатного промежуточного звена [56]. При образовании пентакоординированного интермедиата соединения протон из каталитического серина переносится на каталитический гистидин. Стереохимия групп, связанных с фосфором, инвертируется. Каталитический гистидин остается протонированным, так что опосредованное водой дефосфилирование замедляется. После старения (деалкилирования фосфорорганического соединения) положительно заряженный каталитический гистидин стабилизирует отрицательно заряженный состаренный аддукт и холинэстеразы, делая невозможной ни спонтанную реактивацию, ни реактивацию при помощи оксимов. Реакция старения ускоряется благодаря π -катионному взаимодействию между Trp86 активного центра и алкильным фрагментом, который образуется в карбокатионном переходном состоянии. Последовательность превращений в процессе взаимодействия холинэстераз (ХЭ) с ФОС изображена на Рисунок 3.

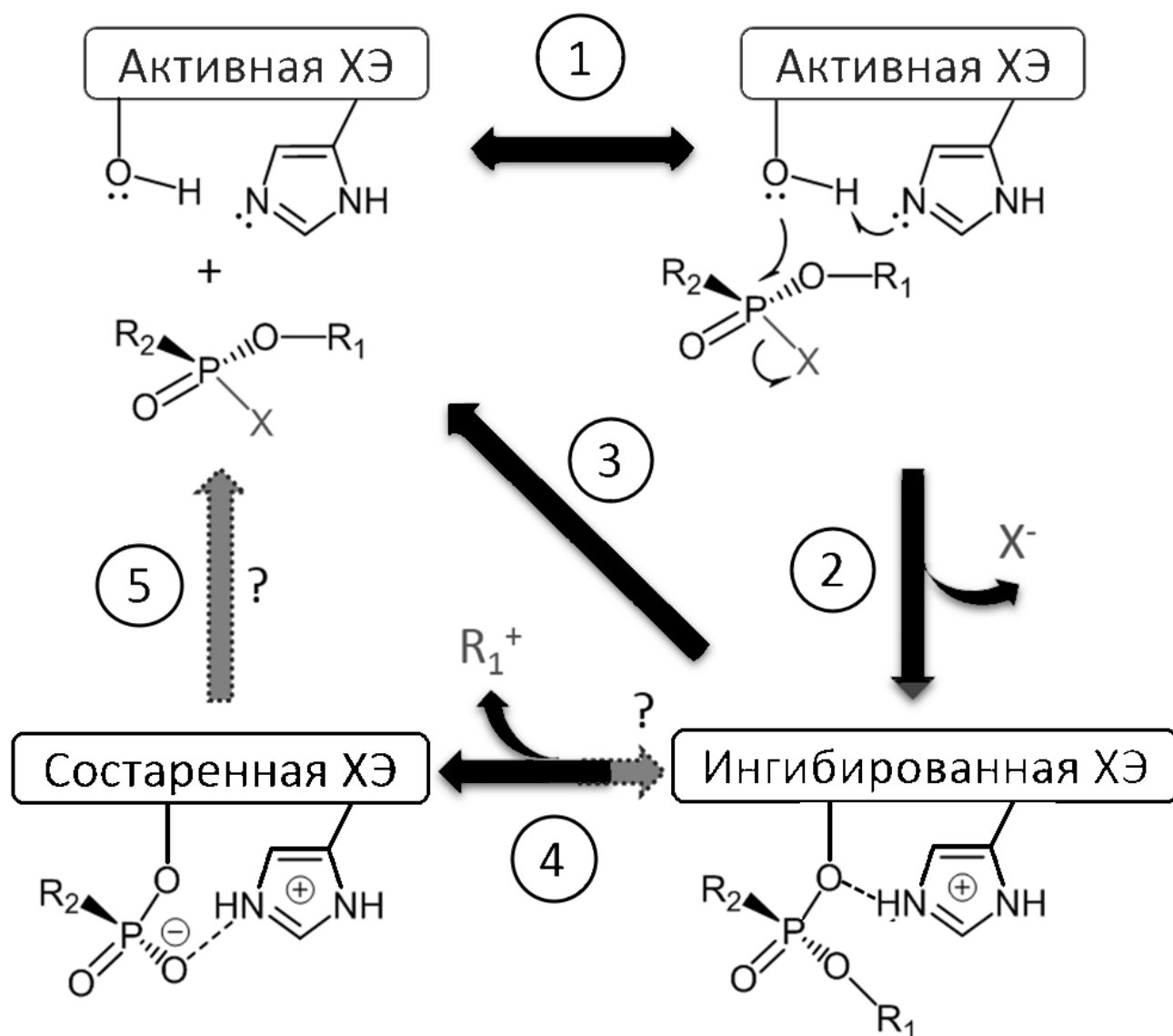


Рисунок 3. Схема процессов, сопровождающих фосфорилирование холинэстераз. Уходящая группа X может быть -F, -CN, тио-группы и др. R₁ – алкильная группа, R₂ может быть алкокси- или алкильной группой.

После формирования обратимого комплекса между ХЭ и ФОС (шаг 1) происходит образование связи Р-О с кислородом каталитического серина, сопровождающееся отщеплением уходящей группы X (шаг 2). Фосфорилированный фермент может быть реактивирован при нуклеофильной атаке на фосфорилированный каталитический серин. Например, в качестве антидотов в экстренной терапии отравления ФОС используются оксимы [57-59] (шаг 3). Вода – слишком слабый нуклеофил для спонтанной реактивации фосфорилированных ХЭ. В конъюгате фосфил-ХЭ может происходить спонтанное

деалкилирование, так называемое «старение». Старение приводит к необратимой инактивации фермента [60, 61], поскольку состаренный фермент не реактивируется нуклеофильными агентами (шаг 4). Реакция деалкилирования может быть очень быстрой ($t_{1/2} = 3$ мин при 37°C для чАХЭ, фосфорилированной зоманом). В недавних работах было продемонстрировано, что реактивация состаренного фермента возможна за счет реалкилирования определенными реагентами состаренной ХЭ (реакция, обратная реакции 4, с последующей реакцией 3 получили в литературе название «оживление» или «воскрешение» [62]. Прямой гидролиз состаренного аддукта (шаг 5) все ещё считается невозможным.

Устойчивость аддукта старения объясняется его структурным сходством с тетраэдрическим интермедиатом стадии деацилирования процесса катализа гидролиза ацетилхолина. Обеспечение стабилизации тетраэдрического интермедиата – одна из функций фермента ХЭ, позволяющих ускорять реакцию гидролиза основного субстрата [63]. Кроме того, существенную роль играет отрицательный заряд аддукта, препятствующий подходу нуклеофила, необходимого для реактивации.

Бимолекулярные константы скорости фосфилирования холинэстераз составляют от 10^7 до $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$.

Глава 2. Узел из четырёх альфа спиралей – распространённый мотив четвертичной структуры. Литературные данные

Узел из четырёх альфа-спиралей – это тип четвертичной структуры, который часто встречается при формировании димеров [64]. Узлы из четырёх альфа-спиралей встречаются в виде олигомеров отдельных полипептидных цепей, в виде изолированных элементов фолдинга (цитохром b562) или в виде доменов в более крупных белках (лизоцим T4) [65].

Белки, имеющие узел из четырёх альфа-спиралей, также функционально разнообразны. Например, помимо описанных выше холинэстераз, к ним относятся нейролигины, цитохром b562, который участвует в переносе электрона, и лизоцим T4, расщепляющий полисахариды. Кроме того, мотивы с четырьмя спиральями обнаруживаются в важных с медицинской точки зрения белках, таких как гормон роста человека, интерлейкины, клеточная форма прионного белка (который связан с группой нейродегенеративных расстройств).

Поскольку белки, имеющие узел из четырёх альфа-спиралей, распространены и функционально важны, мотив интенсивно изучался ЯМР и рентгеновской кристаллографией.

Относительная простота мотива с четырьмя спиральями делает его подходящей модельной структурой для исследования правил, регулирующих формирование четвертичной структуры.

2.1. Геометрические аспекты формирования узла из четырёх альфа спиралей

Конкретные узлы из четырёх альфа спиралей могут различаться углами, под которыми находятся спирали друг относительно друга в узлах, относительной ориентацией соседних спиралей (параллельная или антипараллельная ориентация) и принадлежностью спиралей к субъединицам.

Согласно модели формирования взаимодействия спиралей в узле из четырёх альфа спиралей, боковые цепи, выступающие из спиралей, создают гребни на их поверхности. Два набора таких гребней особенно важны: гребни, образованные

остатками, находящимися в трёх остатках друг от друга в последовательности ($i - 3, i, i + 3, \dots$) и те, которые образованы остатками, разделёнными четырьмя остатками в последовательности ($i - 4, i, i + 4, \dots$). Для образования угла 50° , ребра $i + 4$, образованные каждой спиралью, должны попасть в пазы между гребнями $i + 4$ другой. Для пересечения под углом 20° $i + 4$ гребни одной спирали попадают в пазы между гребнями $i + 3$ другой. Конечно, $i + 3$ гребни последней спирали также оказываются в $i + 4$ пазах первой. Угол 20° чаще встречается в узле из четырёх альфа спиралей, поскольку при такой конфигурации образуется контакт с большей поверхностью.

Относительная ориентация спиралей друг относительно друга создаёт три типа топологий (Рисунок 4). Однако, какой бы ни была топология расположения спиралей, непосредственно контактирующие спирали антипараллельны.

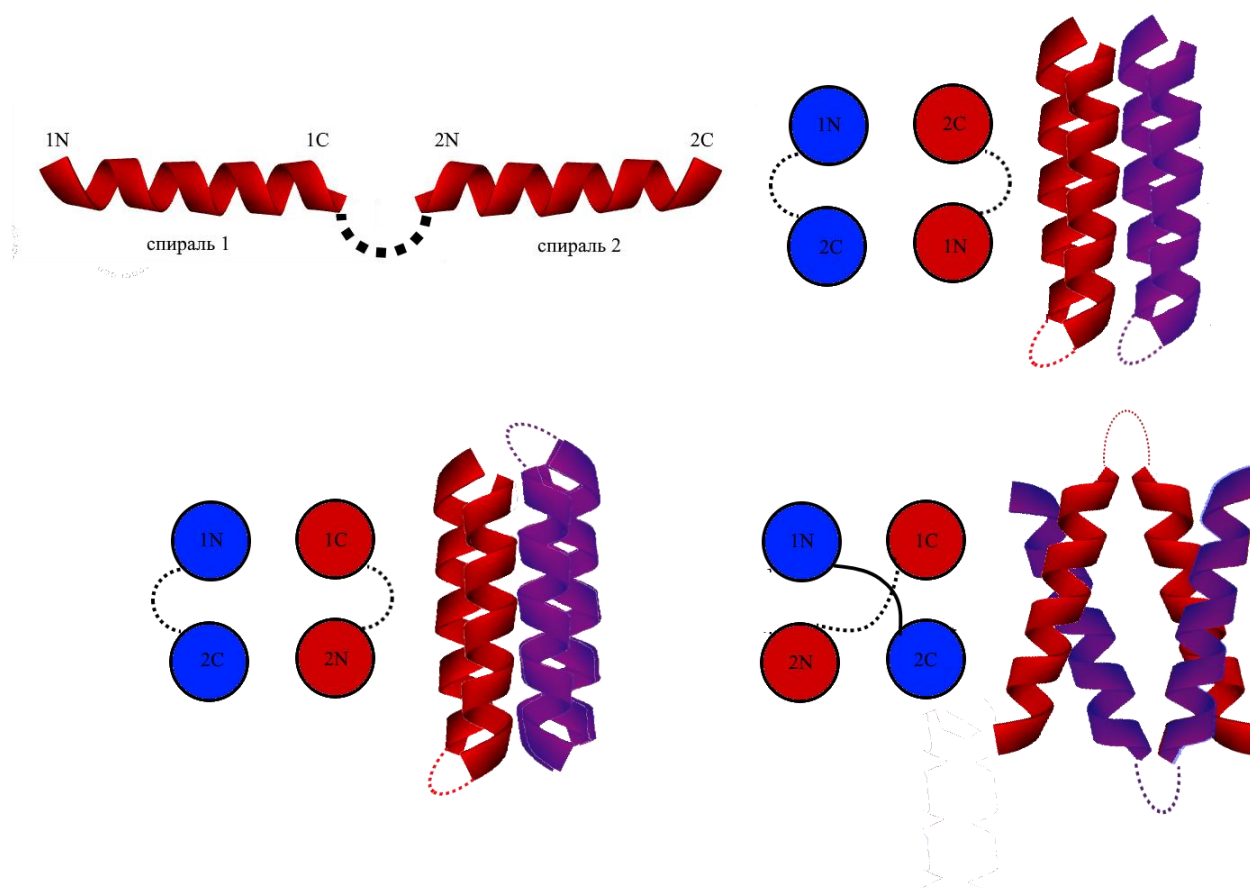


Рисунок 4. Варианты образования узла из четырёх альфа-спиралей.

Топология "вверх-вниз-вверх-вниз" является самой простой из возможных для белка с четырьмя альфа спиральями; она позволяет коротким петлям в межспиральной области и смежным в последовательности спиральям, быть также

смежными в пространстве. Эта топология может образовывать одну из двух форм: с левым или правым поворотом.

Другая возможная топология демонстрируется суперсемейством ферритинов: расположение спиралей «вверх-вниз-вниз-вверх». Длинная петля, соединяющая спирали 2 и 3, пересекает узел. Таким образом, спираль 3 оказывается между спиралями 1 и 4, а не между 2 и 4.

Третий тип топологии – «вверх-вверх-вниз-вниз». Белки с узлом из четырёх альфа спиралей, имеющим такую топологию, обладают двумя длинными петлями, которые пересекают друг друга. Эти длинные петли возникают между спиралями 1 и 2, и 3 и 4 [66].

2.2. Типы взаимодействия между субъединицами, формирующими узел из четырёх альфа спиралей

Предполагается, что основными взаимодействиями между мономерами в случае образования этого мотива, являются гидрофобные взаимодействия между спиралями, макродипольные взаимодействия между спиралями и электростатическое притяжение петель, окружающих эти спирали [67].

У всех растворимых глобулярных белков, охарактеризованных на сегодняшний день, неполярные аминокислоты погружены внутрь белка, а поверхности белков богаты полярными аминокислотными остатками. Термодинамически это разделение может быть объяснено с точки зрения гидрофобного эффекта: вода вокруг неполярных фрагментов на поверхности имеет тенденцию быть упорядоченной, и, следовательно, удаление таких группировок из их водной среды является энтропийно предпочтительным. Поверхности спиралей, образующих узел, преимущественно гидрофобны. Таким образом, при образовании узла из четырёх альфа спиралей, неполярные аминокислоты оказываются внутри белка, что стабилизирует четвертичную структуру.

Пептидная связь является полярной с небольшим избытком отрицательного заряда на атомах кислорода и азота, сбалансированных избытком положительного заряда у атомов углерода и водорода. Вместе они генерируют дипольный момент приблизительно 3,5 Дебая параллельно вектору углерод-кислород. Поскольку

пептидные связи в α -спирали почти параллельны друг другу, и диполи являются векторными величинами, отдельные диполи могут быть суммированы, формируя макродиполь. Большая часть белков, имеющих узел из четырёх альфа спиралей, имеет в области контакта антипараллельные спирали, то есть спирали с противоположно направленными векторами дипольного момента.

По сравнению с некоторыми из сил, участвующих в фолдинге белка, величина спирально-дипольных взаимодействий мала. Тем не менее, учитывая неопределенность, связанную с их величиной и тем, что энергия димеризации не очень велика, они могут играть важную роль в формировании четвертичной структуры.

Замена аминокислотных остатков петель на пролин, приводящая к изменению структуры петель, приводит к снижению устойчивости димеров за счёт уменьшения области контакта [68]. Конформационно устойчивые петли, имеющие дополнительные электростатические взаимодействия, могут стабилизировать узел из четырёх альфа спиралей на несколько килокалорий [69].

2.3. Нейролигины – белки, образующие четвертичную структуру при помощи узла из четырёх альфа-спиралей

Нейролигины (НЛГ), мембранные белки типа I, находятся на постсинаптической мембране и обеспечивают образование и сохранение синапсов между нейронами [70]. Нейролигины выступают лигандами белков клеточной адгезии β -нейрексина, расположенных в пресинаптическом пространстве. Взаимодействие нейролигина и β -нейрексина приводит к образованию синапса. [71] Нейролигины также влияют на свойства нейронных сетей, определяя синаптические функции, и опосредуют передачу сигналов, участвуя в синаптогенезе за счёт стабилизации ключевых синаптических компонентов. Нейролигины влияют на скорость созревания клетки, взаимодействуют с другими постсинаптическими белками для локализации рецепторов нейротрансмиттеров и каналов постсинаптической плотности по мере созревания клетки. Кроме того, нейролигины экспрессируются в периферических тканях человека и, как было

установлено, играют роль в образовании сосудов [72]. У людей мутации в генах, кодирующих нейролигины, связаны с аутизмом и другими расстройствами [73].

Внеклеточный домен нейролигинов состоит в основном из области, которая гомологична ацетилхолинэстеразе, но аминокислоты, важные для катализа в АХЭ, не сохраняются в нейролигинах, у которых отсутствует эстеразная активность. Кроме того, область, гомологичная АХЭ, имеет решающее значение для правильного функционирования нейролигинов [74].

Наряду с другими белками клеточной адгезии холинэстеразного типа, нейролигины имеют далекого общего предка с холинэстеразами. По результатам филогенетического анализа [75], нейролигины беспозвоночных являются предками других членов этой группы. Нейролигины появились относительно рано в эволюции позвоночных, до отделения ветвей костных рыб и млекопитающих. Разделение с холинэстеразами произошло ещё раньше, но холинэстеразы насекомых филогенетически ближе к нейролигинам, чем холинэстеразы хордовых.

Проведённый нами филогенетический анализ при помощи онлайн сервера Uniprot [76] приведён на Рисунок 5 и согласуется с литературными данными, приведёнными выше, однако включает наиболее интересные для нашего исследования последовательности.

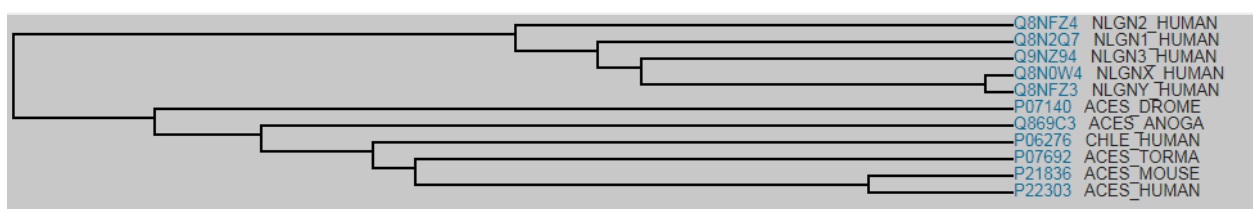


Рисунок 5. Филогенетический анализ холинэстераз и нейролигинов.

Сравнение последовательностей холинэстераз и домена холинэстеразного типа нейролигинов приведено на Рисунок 6.

ACES_MOUSE	7	PLHTPSLAFF-----LLFLLLSL-----LGGGARAEGREDPQLLVVR	44
ACES_DROME	16	PL---PLTIP-----LPLVLV-----LSLHLSGVCGVIDRLVQTS	48
CHLE_HUMAN	1	-MHSK-VTII-----CIRFLFWF-----LLLCLMLGKSHSTEDDIIATK	37
NLGN1_HUMAN	15	AVMA---CLVH---RGL-GAPLTLCLMLG-----CLLQAGHVLSQKLLDDVDPLVATN	58
NLGN2_HUMAN	4	LA---LCLVGLAGAQRRGGGGPGG---G-----APGGPGLGLGSLGEERFPVNTA	47
NLGN3_HUMAN	4	RLGPPSLSLSPKPTVGR---SLCLTLWFLS-----LALRA-----SIQAPAPTWNTH	47
ACES_ANOVA	121	IGHGESVRII-----DAELGTLEHVHSGATPRRRGLTRRESNSDANDNDPLVNTD	171
ACES_TORMA	6	LLVTSLSGLV-----LHLVLVLCQADDDSELLVNTK	35
ACES_HUMAN	7	LLHTPSLASP-----LGGGVGAEGREDDELVTVR	44
NLGNX_HUMAN	11	PLLFTFVC-----VML-NSNVLLWITA-----LAIKFT---LIDSQAQYFVNTN	51
NLGNV_HUMAN	11	PLLFTSVC-----VML-NSNVLLWITA-----LAIKFT---LIDSQAQYFVNTN	51
:			
ACES_MOUSE	45	GSQIRGIRLKAPGG---PWSAFLGIFFAEPVGSRRFMPEPKRPSGVLDATTFQNVY	101
ACES_DROME	49	SSPVRGRSVTVQGR---EVHVITGIEYAKPEVEDLRFKEVPAEPVHGLDATTGLSATV	105
CHLE_HUMAN	38	NGKVRGMNLTVEGG---TWTAFLGIEFYAQPEPLGRLEKKEQSLTKNSDWNAIKYANSIC	94
NLGN1_HUMAN	59	FKKIRGIKKELNNEILGPVQQLGVEFYAAPPTGERRFQPEPPSPSSDIRNATQFAPVP	118
NLGN2_HUMAN	48	YGRVGRVRELNNEILGPVQQLGVEFYATPELGARRFQPEAPASPPGRNATLTPAPV	107
NLGN3_HUMAN	48	FGKLRGARVPPLPSEILGPVQQLGVEFYAAPPTGEKRFELPEPPSPSSGGRNATHFFPVP	107
ACES_ANOVA	172	KGRIRGITVDAPSG---KKVDVNLGIEFYAQPEVGLRFRHERPAEKTVGLNATTPPNSV	229
ACES_TORMA	36	SGKVMRTIRPVLSS---HLSAFLGIEFYAQPEVGNMRFERPEPKKPSGVNASTYPNNQ	92
ACES_HUMAN	45	GSQIRGIRLKTPGG---PWSAFLGIFFAEPVGSRRFMPEPKRPSGVLDATTFQNVY	101
NLGNX_HUMAN	52	YKIRGLRITPLPNEILGPVQQLGVEFYAAPPTGERRFQPEPPSPSSGGRNATHFFPVP	111
NLGNV_HUMAN	52	YKIRGLRITPLPNEILGPVQQLGVEFYAAPPTGERRFQPEPPSPSSGGRNATHFFPVP	111
* : : : * : : : *			
ACES_MOUSE	102	QYVDITLYPGFEGTEMNPN-----NRELSDDLYLNWVTFYPR-----	138
ACES_DROME	106	QERYEYFPGFSGEEMNPN-----NTVSEDDLYLNWVWAAKARLRHGRGANGGEH-	155
CHLE_HUMAN	95	QNIDQSFPGFHGSEMNP-----NIDLSDDLYLNWVWIAAPK-----	131
NLGN1_HUMAN	119	QNIIDGRLPVEMLPVWFTNNLDVVSYSYVDQDSEDLYLNLYVETEDGPLTKKRDEAT---	175
NLGN2_HUMAN	108	QNLHG-ALPAIMLPVWFTDNLEAAATYVQDSEDLYLNLYVETEDGPLTKKRDEAT---	163
NLGN3_HUMAN	108	QNIHT-AVPEVMLPVWFTANLDIVATYIQEPNEDLYLNLYVETEDVVKRISKECARPNK	166
ACES_ANOVA	230	QIVDITVFGDFPGATMNPN-----NTFLSDDLYLNWVWAAKARLR-----	266
ACES_TORMA	93	QYVDEQFPGFSGEEMNPN-----NREMSDDLYLNWVWESPR-----	129
ACES_HUMAN	102	QYVDITLYPGFEGTEMNPN-----NRELSDDLYLNWVTFYPR-----	138
NLGNX_HUMAN	112	QHLDERSLLHDMPLPWFTANLDLMTYVQDQDSEDLYLNLYVETEDDIIH-----	160
NLGNV_HUMAN	112	QHLDERSLLHDMPLPWFTANLDLMTYVQDQDSEDLYLNLYVETEDDIIH-----	160
* : : : * : : : *			
ACES_MOUSE	139	-----PASPTPLVNIYIGGGFYSGAASLDVYDGRFL	169
ACES_DROME	156	-----PNGKQADTDHLHN-----GNPQNTTNGPLILNIYIGGGFMTGSATLDIYNADIM	205
CHLE_HUMAN	132	-----PKMA-TVLIWIYIGGGFQTGTSLSLHVYDGKFL	161
NLGN1_HUMAN	176	-----LNPPDITDIRDSGGPKPMVVIYHGGSYMEGTG---NLYDGSVL	214
NLGN2_HUMAN	164	-----LNPPDIT-DIRDPGKKPVMLFIHGGSYMEGTG---NMFDGSVL	201
NLGN3_HUMAN	167	KICRKGSGGAKKQGEDLADNDGDEDEDIRDSGAKPMVVIYHGGSYMEGTG---NMIDGSIL	224
ACES_ANOVA	267	-----PKMA-AVMLWIYIGGGFYSGAASLDVYDGRFL	296
ACES_TORMA	130	-----PKSA-TVMLWIYIGGGFYSGAASLDVYNGKYL	159
ACES_HUMAN	139	-----PTSPTPLVNIYIGGGFYSGAASLDVYDGRFL	169
NLGNX_HUMAN	161	-----DQNSKKPMVVIYHGGSYMEGTG---NMIDGSIL	190
NLGNV_HUMAN	161	-----EQNSKKPMVVIYHGGSYMEGTG---NMIDGSIL	190
. : : : : * : : : :			
ACES_MOUSE	170	AQVEGAVLVSMNYRVGTGFLALPG-----SREAPGNVGLDQRLALQVQENIAAFGG	223
ACES_DROME	206	AAVGNVIVASFQYRVGAFGLHLAPEMPSEFAEEAPGNVGLDQALALQVQKNIAAFGG	265
CHLE_HUMAN	162	ARVERVIVVSMNYRVGALGFLALPG-----NPEAPGNMGLFDQQLALQVQKNIAAFGG	215
NLGN1_HUMAN	215	ASYGNVIVITVNYRIGVLGFLST-G-----DQAARKNYGLLDQIALRWISNIAFFGG	267
NLGN2_HUMAN	202	AAYGNVIVATLNRYRIGVLGFLST-G-----DQAARKNYGLLDQIALRWISNIAFFGG	254
NLGN3_HUMAN	225	ASYGNVIVITLNRYRVGLGFLST-G-----DQAARKNYGLLDQIALRWISNIAFFGG	277
ACES_ANOVA	297	ASEENVIVVSLQYRVASLGLFLG-----TPEAPGNAGLFDQNLALRWISNIAFFGG	349
ACES_TORMA	160	AYTEEVLVSLSYRVGAFGLALHG-----SQEAPGNMGLDQRMALQVVDNIQFEGG	213
ACES_HUMAN	170	VQAERTVLVSMNYRVGAFGLALPG-----SREAPGNVGLDQRLALQVQENIAAFGG	223
NLGNX_HUMAN	191	ASYGNVIVITINRYRIGLGLFLST-G-----DQAARKNYGLLDQIALRWIEENVGAFGG	243
NLGNV_HUMAN	191	ASYGNVIVITINRYRIGLGLFLST-G-----DQAARKNYGLLDQIALRWIEENVGAFGG	243
. : : : : * : : : *			
ACES_MOUSE	224	DPMSVTLFGESAGAAVGMHILSLPSR-----SLFHRAVLQSGTPNGPNATVSAGI	274
ACES_DROME	266	NPENWTLFGESAGSSSVNAQLMSPVTR-----GLVKRGMMSQGTMMAPNSHMTSEK	316
CHLE_HUMAN	216	NPKSVTLFGESAGAAVSLHLSPGSH-----SLFTRAILQSGSFNAPNAVTSLYE	266
NLGN1_HUMAN	268	DELRLITVFGSGAGGSCVNLTLTSHYSEGNRWSSTKGLFQRAIAQSGTALSSNAVS--FQ	325
NLGN2_HUMAN	255	DEERITLFGSGAGASCYNLLTLTSHHSE-----GLFQKALIAQSGTALSSSVN--YQ	303
NLGN3_HUMAN	278	DEERITVFGSGIGASCYNLLTLTSHHSE-----GLFQRAIAQSGTALSSNAVN--YQ	326
ACES_ANOVA	350	DESRVTLFGESAGAVSVSLHLALSRL-----DLFQRAILQSGSPTAPNALVSVREF	400
ACES_TORMA	214	DPKVTTLFGESAGRASVGMHILSPGR-----DLFERRAILQSGSPNCPNATVSVAE	264
ACES_HUMAN	224	DETSVTLFGESAGAAVGMHILSPSR-----SLFHRAVLQSGAPNGPNATVGMGE	274
NLGNX_HUMAN	244	DEKRVTLFGSGAGASCYNLLTLTSHYSE-----GLFQKALIAQSGTALSSNAVN--YQ	292
NLGNV_HUMAN	244	DEKRVTLFGSGAGASCYNLLTLTSHYSE-----GLFQKALIAQSGTALSSNAVN--YQ	292
* : : : : * : : : *			

Рисунок 6. Сравнение аминокислотных последовательностей нейролигинов и холинэстераз с использованием номенклатуры Uniprot: ACES_MOUSE – AXЭ *Mus musculus*, ACES_DROME – AXЭ *Drosophila melanogaster*, CHLE_HUMAN – БХЭ *Homo sapiens*, NLGN1,2,3_HUMAN – нейролигины 1,2 и 3 *Homo sapiens*, ACES_ANOGA – AXЭ *Anopheles gambiae*, ACES_TORMA – AXЭ *Torpedo californica*, ACES_HUMAN – AXЭ *Homo sapiens*, NLGNX,Y_HUMAN – нейролигины 4 с различными якорями.

Обнаружено 81 идентичных и 130 однотипных аминокислот (7% и 13% идентичности и схожести рассмотренных 11 белков с учётом пропусков). При этом в области, отвечающей за образование контакта между двумя димерами, 5 идентичных и 13 однотипных аминокислот из 39 остатков, участвующих в формировании контакта (13% и 33% идентичности и схожести соответственно). Кристаллографические данные демонстрируют структурное сходство нейролигинов с АХЭ, кристаллическая структура которой была тщательно изучена, и соответствие между их физическими параметрами убедительно указывают на то, что область контакта димера нейролигинов организована по типу узла из четырёх альфа спиралей, что типично для α/β -гидролаз. Такое расположение домена димеризации согласуется с механизмом ассоциации с нейрексином [77].

В данной работе было выяснено, какие взаимодействия способствуют формированию узла из четырёх альфа спиралей; в каких пределах может изменяться угол между спиральями, чтобы образованный контакт можно было отнести к узлу из четырёх альфа-спиралей; какие особенности строения БХЭ приводят к тому, что при кристаллизации не полностью гликозилированного димера узел не образуется; в ключе изученных взаимодействий описаны особенности формирования узла из четырёх альфа-спиралей в структуре вновь полученного нейролигина 3.

Глава 3. Формирование узла из четырёх альфа спиралей в холинэстеразах и нейролигине 3

3.1. Молекулярная динамика и анализ траектории

Для предварительной подготовки структур к дальнейшему расчёту молекулярная динамика производилась в пакете NAMD2.12 [78] с силовым полем CHARMM36 [79] при постоянном давлении 1 бар с использованием термостата Ланжевина при постоянной температуре равной 298 К. Были добавлены недостающие аминокислотные остатки при помощи программы Modeller [80], оценено протонирование гистидина при помощи пакета Reduce [81], затем добавлены недостающие атомы водорода и сольватная оболочка при помощи пакета Psfgen, входящего в состав VMD [82]. Размеры сольватной оболочки выбирались так, чтобы наименьший слой молекул воды в образованной ячейке был не менее 10 Å. Затем производилась минимизация молекул воды и добавленных атомов при фиксированных атомах белка из кристаллографической структуры в течение 500 пс, затем при фиксированном положении атомов белка производилась молекулярная динамика молекул воды до стабилизации размеров коробки (500 пс) с последующей минимизацией и повторением молекулярной динамики с фиксированным положением тяжёлых атомов белка до стабилизации размеров коробки. Полученные оптимизированные системы были использованы для дальнейших молекулярно-динамических расчётов и для оценки электростатических взаимодействий между мономерами.

Дальнейшие молекулярно-динамические расчёты производились также при постоянном давлении 1 бар с использованием термостата Ланжевина при постоянной температуре равной 298 К. Для чАХЭ, рАХЭ, мАХЭ и БХЭ было получено по 3 траектории длиной по 100 нс, для НЛГЗ одна траектория длиной 100 нс, для дАХЭ – одна траектория длиной 50 нс.

3.2. Геометрические аспекты формирования узла из четырёх альфа-спиралей: кристаллографические структуры и молекулярная динамика

Углы между альфа-спиралями были оценены при помощи плагина orient в составе VMD.

Таблица 2. Угол между альфа спиралями A13 и B18

Белок	Угол между спиралями $\alpha 13$ мономера А и $\alpha 18$ мономера В в кристаллических структурах	Угол между спиралями $\alpha 13$ мономера А и $\alpha 18$ мономера В в молекулярной динамике
чАХЭ (PDB IDs 4EY4, 5FPQ, 4EY5, 4M0F, 4M0E, 1B41,)	$9 \pm 2^\circ$	$9 \pm 4^\circ$
мАХЭ (PDB IDs 1MAA, 1KU6, 5DTI, 1J06)	$6 \pm 4^\circ$	$9 \pm 3^\circ$
рАХЭ (PDB IDs 1W75, 6G1U, 1EA5, 2J3D, 1FSS, 1W75)	$15 \pm 4^\circ$	$14 \pm 4^\circ$
БХЭ (гликозилированная) (PDB ID 4AQD, 5K5E, 4XII, 5DYT, 4TPK)	$14 \pm 3^\circ$	$11 \pm 4^\circ$
дАХЭ (1QO9)	16°	$14 \pm 3^\circ$
НЛГ1 (3BIX)	20°	
НЛГ2 (3BL8)	20°	
НЛГ3 (не опубликована)	15°	$10 \pm 5^\circ$
НЛГ4 (3BE8)	11°	

Во всех кристаллографических структурах АХЭ всех видов образует димер одного типа, при этом углы между альфа-спиралями находятся в пределах от 9° до 16° . БХЭ при полном гликозилировании образует димер такого же типа с углом 18° , а при неполном "свёрнутый" димер с углом 60° . Нейролигины четырёх типов образуют димеры с углами от 11° до 20° (см. Таблица 2).

Результаты, представленные в Таблица 2, показывают, что различия в значениях углов между спиралями в димерах в кристаллических структурах по сравнению с углами, полученными при моделировании молекулярной динамики (МД), минимальны. Также, димеры всех изучаемых белков образуют узел из альфа-спиралей под углом не более 20° , что соответствует наиболее энергетически выгодной упаковке альфа-спиралей в узел.

3.3. Оценка аполярных взаимодействий.

Чаще всего под аполярными подразумевают гидрофобные взаимодействия. Их природу связывают с энтропийным фактором. Гидрофобную поверхность белковых молекул можно рассматривать как набор больших полостей внутри водного раствора, предотвращающих образование водородных связей. Таким образом, сеть водородных связей должна быть организована специфическим образом, что снижает общую энтропию системы белок-вода [83]. При димеризации белка возможно уменьшение гидрофобных поверхностей за счёт области контакта, что делает димер энтропийно более выгодным.

Подсчёт количества гидрофобных взаимодействий используется в многочисленных программах, оценивающих возможность образования ассоциатов белок-белок или белок-лиганд [84-86]. Гидрофобное взаимодействие считается существующим, если два гидрофобных центра находятся на определённом расстоянии друг от друга ($3,7\text{--}4\text{\AA}$ в зависимости от подхода), также учитывается, в какой степени остатки экспонированы. Однако, исходя из природы гидрофобных взаимодействий, очевидно, что значение имеет не только наличие контакта между аминокислотами, но и размер области контакта.

Другой способ описания гидрофобных взаимодействий – расчёт поверхности, доступной для контакта с растворителем (SASA, ПДКР) [87].

Поверхность, доступная для растворителя, рассчитывается при помощи перемещения по поверхности белка виртуальной молекулы растворителя с заданным пробным радиусом. При некотором приближении можно считать, что энергия аполярных взаимодействий линейно зависит от SASA. При этом значение SASA очень чувствительно к радиусу перемещаемой виртуальной молекулы растворителя. Общепринятым подходом к выбору радиуса растворителя в водных растворах является эффективный радиус молекулы воды (1,4 Å)

Третий подход к расчёту энергии сольватации/десольватации, комбинирующий SASA подход с расчётом объёма, занимаемого молекулой (SAV), и с притяжением растворителя к растворённому веществу в соответствии с уравнением Леннарда-Джонса, представлен в программном пакете APBS, однако находится в процессе разработки и временно включает в себя только расчёт SASA и SAV [88].

Количество гидрофобных контактов между мономерами в димерах холинэстераз различных типов приведено в Таблица 3.

Таблица 3. Гидрофобные контакты в различных белках

Белок	Количество контактирующих а.к. (включая π -N ⁺ и π - π взаимодействия)	Изменение SASA при димеризации
чАХЭ	12	-1211
мАХЭ	12	-1243
рАХЭ	12	-1261
дАХЭ	7	-901
БХЭ	3	-751
НЛГ1	8	-954
НЛГ2	9	-937
НЛГ 3	7	-950
НЛГ 4	8	-1042

Также рассмотрены различные кристаллографические структуры чАХЭ, количество гидрофобных контактов в них приведено в Таблица 4.

Таблица 4. Количество контактирующих а.к. (включая π -N+ и π - π взаимодействия) в различных кристаллографических структурах чАХЭ

PDB ID	Гидрофобные контакты между спиралями	Гидрофобные контакты между спиралями и петлями	Гидрофобные контакты между петлями
4EY4	8	4	0
5HQ3	8	4	0
5FPQ	8	4	2
4EY5	8	4	0
4M0F	8	4	2
4M0E	8	4	2
1B41	8	4	2

Таким образом, 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.

Было рассчитано изменение доступной для растворителя гидрофобной поверхности белка для каждого кадра молекулярно-динамической траектории. Полученные значения приведены на Рисунок 7. Следует отметить, что значения для кристаллографических структур, не подвергшихся молекулярной динамике, входят в интервал значений для кадров молекулярной динамики. Это говорит о том, что при моделировании МД в водном растворе структура границы раздела димеров существенно не нарушается по сравнению с границей раздела димеров в кристаллографических структурах.

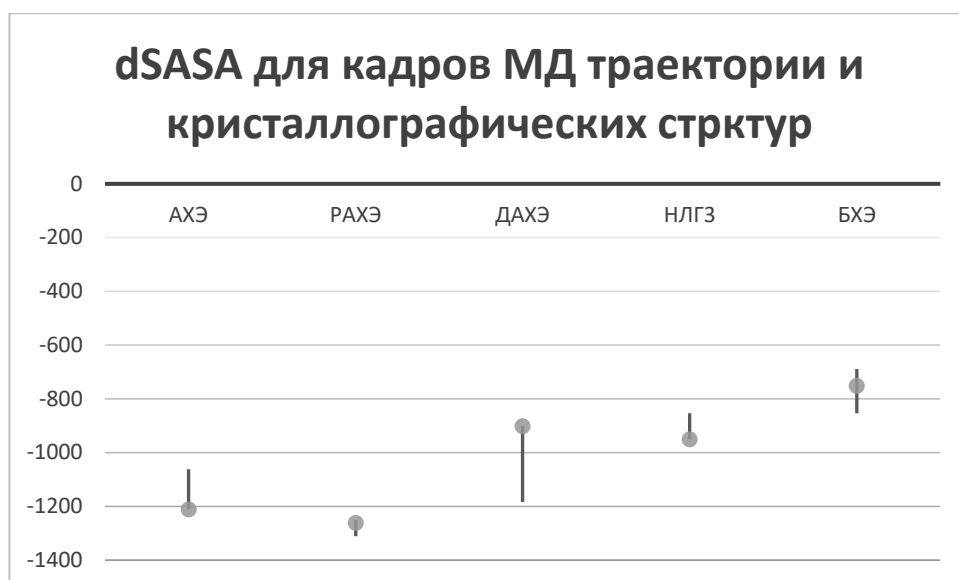


Рисунок 7. Точками отмечены значения dSASA для рассмотренных кристаллографических структур, линии соответствуют среднему значению dSASA±стандартное отклонение для молекулярно-динамических траекторий димеров в физиологическом растворе.

В АХЭ имеется 12 пар аминокислот, участвующих в гидрофобных контактах (нумерация чАХЭ): Leu373-Ala542, Ala377-Phe535, Leu380-Ala530, Leu380-Phe535, Trp385-Ala530, Leu386-Ala526. В БХЭ из-за замены аминокислот в эквивалентных положениях на заряженные или полярные, некоторые из этих пар отсутствуют.

Размер поверхности, доступной для растворителя на границе раздела димеризации (Δ SASA – разница между значениями SASA для димера и двух мономеров) в БХЭ значительно меньше по сравнению с кристаллическими структурами всех типов АХЭ. Результаты расчета значений Δ SASA вдоль траекторий МД демонстрируют ту же зависимость.

3.4. Полярная энергия связывания

Полярная энергия связывания была рассчитана в программе APBS. По линеаризованному уравнению Пуассона-Больцмана

$$\nabla(\varepsilon(x)\nabla\varphi(x)) = \rho_p(x) + \sum_i z_i^2 e^2 c_i^0 \frac{\varphi(x)}{k_b T} \lambda(x) \quad (1)$$

где $\varepsilon(x)$ – диэлектрическая постоянная, $\varphi(x)$ – потенциал, $\rho(x)$ – плотность заряда, z_i – заряд i -ого иона, c_i – концентрация i -ого иона, $\lambda(x)$ характеризует доступность ионов в данной точке пространства.

Рассчитаны энергии

$$E = \frac{1}{2} \int_V \rho(x) \varphi(x) dx \quad (2)$$

где $\varphi(x)$ – потенциал, $\rho(x)$ – плотность заряда используемые в формуле:

$$E_{AB} = E_{noB} - E_A + E_{noA} - E_B + E_{Coul} \quad (3)$$

где E_A – энергия мономера А, E_B – энергия мономера В, E_{noA} – энергия димера, в котором мономеру А присвоены нулевые заряды, E_{noB} – энергия димера, в котором мономеру В присвоены нулевые заряды. Вклад от электростатического притяжения E_{Coul} между двумя мономерами был рассчитан по формуле:

$$E_{Coul} = \sum_{i=1}^n \varphi_i q_i \quad (4)$$

где φ_i – потенциал, наведённый атомами одного мономера в точку, соответствующую i -тому атому второго мономера, q_i – заряд в точке, а n – число атомов в мономере белка.

Данная процедура позволяет выделить вклад в электростатическое притяжение (без учёта гидрофобных взаимодействий) от отдельных элементов белка, тогда за n принимается количество атомов, участвующих в формировании той или иной структуры.

Для анализа полярных взаимодействий первоначальная подготовка структуры производилась по процедуре, аналогичной для подготовки к проведению молекулярной динамики, за исключением заключительной оптимизации молекул воды.

При подобном способе оценки полярного взаимодействия учитываются не различные типы взаимодействия по отдельности, а суммарный результат, учитывающий все возможные типы взаимодействий: солевые мостики, водородные связи, π -N⁺ взаимодействия, а также взаимодействие мономеров как целого, связанное с несимметричным распределением заряда в белке. Ряд процедур позволяет нам выделить отдельные участки взаимодействия и вклад определённых межмолекулярных связей.

В Таблица 5 показана полярная энергия связывания, рассчитанная для фиксированных кристаллографических структур каждого исследуемого белка.

Таблица 5. Полярная энергия связывания в различных белках.

	Энергия десольватации, кДж/моль	Электростатический вклад в энергию связывания, кДж/моль	Полярная энергия связывания, кДж/моль
чАХЭ	27	-68	-14
мАХЭ	27	-66	-12
рАХЭ	30	-88	-28
дАХЭ	22	-38	6
БХЭ	17	-63	-29
НЛГ1	36	-40	32
НЛГ2	16	38	70
НЛГ 3	9	13	31
НЛГ 4	12	13	37

Рассчитанные энергии оказываются в большом диапазоне, причём в случае нейролигинов электростатическое взаимодействие мономеров как целого не благоприятствует формированию димера.

Также были рассчитаны полярные энергии связывания в различных кристаллографических структурах чАХЭ (Таблица 6).

Таблица 6. Полярная энергия связывания в различных кристаллографических структурах чАХЭ

PDB ID	Энергия десольватации, кДж/моль	Электростатический вклад в энергию связывания, кДж/моль	Полярная энергия связывания, кДж/моль
4EY4	27	-68	-14
5FPQ	27	-56	-2
4EY5	19	-38	0
4M0F	23	-70	-24
4M0E	25	-65	-15
1B41	23	-40	6

Если полученные энергии десольватации достаточно стабильны (что говорит о стабильности области контакта между димерами), то вклад от электростатического притяжения между димерами варьируется в больших пределах, что приводит к различной конечной полярной энергии связывания. При этом различаются не только абсолютные значения, но и знаки конечной энергии.

Чтобы выделить участки белка, оказывающие влияние на формирование димера, были рассчитаны вклады от различных участков мономеров в электростатическое притяжение (Таблица 7, Таблица 8).

Таблица 7. Вклад различных участков белка в электростатическую энергию связывания в различных белках

Белок	спираль α 13	петля между α 13- α 14	доп. петли	петля между α α 18 и β 14	спираль α 18
чАХЭ	-20	-18		-12	-23
мАХЭ	-27	-11		-6	-28
рАХЭ	-4	-26	1	-23	-43
дАХЭ	-9	-2	-2	-1	-27
БХЭ	-33	-8		-8	-24
НЛГ1	-15	-14	-6	2	-15
НЛГ2	6	-1	0	-3	5
НЛГ 3	0	-2	-2	0	4
НЛГ 4	-4	-9	-1	-1	2

Таблица 8. Вклад различных участков белка в электростатическую энергию связывания в различных структурах чАХЭ.

PDB ID	Спираль α 13	Петля между α 13- α 14	Петля между α 18- β 14	Спираль α 18
4EY4	-20	-18	-12	-23
5FPQ	-18	-18	-10	-25
4EY5	-10	-18	-10	-15
4M0F	-28	-13	-10	-38
4M0E	-10	-23	-10	-20
1B41	-18	-10	-8	-20

Вклад от самих альфа-спиралей, формирующих узел, сильно различается в зависимости от исходного белка, оказываясь в ряде случаев слабоположительным. Однако вклад от петель в районе сформированного узла всегда отрицателен и достаточно стабилен для различных структур одного белка.

При этом в случае чАХЭ значение электростатической энергии связывания напрямую зависит от образования солевого мостика между альфа-спиралями (Glu373-Lys535) (Таблица 9, Таблица 10). Солевой мостик изображён на Рисунок 8.

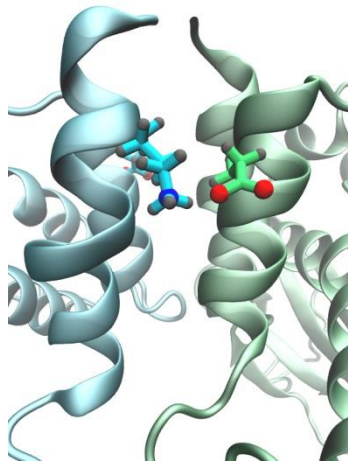


Рисунок 8. Солевой мостик Glu373-Lys535 в структуре чАХЭ (PDB ID 4M0F).

Данный мостик не является стабильным на молекулярно-динамической траектории в растворе с ионизацией, соответствующей физиологическому раствору, один солевой мостик образуется в 53% случаев, два солевых мостика в 35% случаев. Рассчитанные энергии связывания для различных кадров траектории соответствуют данным, полученным для различных кристаллографических структур.

Вклад от петель практически сохраняется, тогда как вклад альфа-спиралей меняется в 5 раз в зависимости от наличия или отсутствия солевого мостика.

Таблица 9. Полярная энергия связывания в различных структурах чАХЭ, полученных в ходе молекулярной динамики

Нс	Энергия десольватации, кДж/моль	Электростатический вклад в энергию связывания, кДж/моль	Полярная энергия связывания, кДж/моль
0,8 (один солевой мостик)	25	-56	-6
24,9 (два солевых мостика)	28	-72	-16
32,1 (нет солевых мостиков)	17	-22	12

Таблица 10. Вклад различных участков белка в электростатическую энергию связывания в различных структурах чАХЭ, полученных в ходе молекулярной динамики

Нс	Спираль $\alpha 13$	Петля между $\alpha 13$ - $\alpha 14$	Петля между $\alpha 18$ - $\beta 14$	Спираль $\alpha 18$
0,8 (один солевой мостик)	-24	-10	-10	-25
24,9 (два солевых мостика)	-28	-12	-8	-27
32,1 (нет солевых мостиков)	-5	-10	-10	-6

Аналогичные результаты получены для различных структур бутирилхолинэстеразы, полученных в процессе молекулярной динамики (Таблица 11, Таблица 12). Солевой мостик Asp367-Lys513 не является стабильным на молекулярно-динамической траектории в растворе с ионизацией, соответствующей физиологическому раствору (один мостик образуется в 60% случаев, два мостика в 4% случаев) и оказывает решающее влияние на вклад спиралей в электростатическую энергию связывания.

Таблица 11. Полярная энергия связывания в различных структурах БХЭ, полученных в ходе молекулярной динамики

Тип ионизации	нс	Число солевых мостиков между спиральями	Энергия десольватации, кДж/моль	Электростатический вклад в энергию связывания, кДж/моль	Полярная энергия связывания, кДж/моль
электро-нейтральный раствор	4,47	1	19	-55	-17
	14,36	2	21	-67	-25
	28,6	1	19	-49	-11
	35,02	1	16	-46	-14
	40,97	2	23	-74	-28
физиологический раствор	2,2	0	9	-27	-9
	5,04	2	21	-70	-28
	31,95	1	9	-29	-12
	60,1	1	13	-38	-13

Таблица 12. Вклад различных участков белка в электростатическую энергию связывания в различных структурах БХЭ, полученных в ходе молекулярной динамики

Тип ионизации	нс	Число солевых мостиков между спиралями	Спираль $\alpha 13$	Петля между $\alpha 13$ - $\alpha 14$	Петля между $\alpha 18$ - $\beta 14$	Спираль $\alpha 18$
электро-нейтральный раствор	4,47	1	-7	-22	-9	-29
	14,36	2	-35	-4	-10	-27
	28,6	1	-6	-6	-6	-39
	35,02	1	-14	-7	-5	-30
	40,97	2	-25	-10	-4	-41
физиологический раствор	2,2	0	-8	-7	-6	-13
	5,04	2	-32	-7	-7	-33
	31,95	1	-9	-5	-7	-15
	60,1	1	-3	-24	-5	-14

Для окончательного отделения влияния солевого мостика между спиралями, проведена замена Q373AK535A в кристаллографических структурах чАХЭ. Показано, что в этом случае наибольший вклад в электростатическую энергию связывания производят петли в районе контакта (Таблица 13, Таблица 14).

Таким образом стабильно благоприятствуют димеризации аполярные взаимодействия между спиралями и электростатическое притяжение между петлями в области контакта.

Таблица 13. Полярная энергия связывания в различных структурах чАХЭ с заменой Q373A/K535A

PDB ID	Энергия десольватации, кДж/моль	Электростатический вклад в энергию связывания, кДж/моль	Полярная энергия связывания, кДж/моль
5FPQ	15	-28	2
4EY5	14	-22	6
4M0F	8	-16	0
4M0E	14	-34	-6
1B41	14	-22	6

Таблица 14. Вклад различных участков белка в электростатическую энергию связывания в различных структурах чАХЭ с заменой Q373A/K535A

PDB ID	Спираль $\alpha 13$	Петля между $\alpha 13$ - $\alpha 14$	Петля между $\alpha 18$ - $\beta 14$	Спираль $\alpha 18$
5FPQ	0	-13	-10	-13
4EY5	0	-15	-10	-8
4M0F	0	-10	-10	-8
4M0E	0	-20	-10	-10
1B41	0	-8	-8	-5

Предварительный вывод из анализа гидрофобных и электростатических взаимодействий заключается в том, что природа стабилизации димеров в АХЭ и БХЭ различна:

1) в АХЭ взаимодействие петель устойчиво, в БХЭ вклад петель в полярную энергию димеризации меньше и менее стабилен. Однако трудно идентифицировать отдельные аминокислоты, ответственные за эту разницу;

2) аполярные взаимодействия играют большую роль в димерах АХЭ. С другой стороны, поверхность межмономерного контакта в БХЭ менее гидрофобна.

В следующих разделах проясняется разница между димерами обоих ферментов

3.5. *In silico* аланиновый скрининг

Для аминокислотных остатков интерфейсов димеризации выполнялся вычислительный аланиновый скрининг двумя методами.

1) Аланиновый скрининг при помощи веб-интерфейса Robetta [89] . Для каждого исследуемого белка были отобраны аминокислотные остатки альфа-спиралей и петель в области контакта, каждый отобранный остаток был заменён на аланин с последующим выбором наиболее энергетически выгодного положения аланина. Функция, описывающая энергию взаимодействия, состоит из линейной комбинации потенциала Леннарда-Джонса для описания взаимодействий атомной упаковки, модели неявной сольватации, потенциала водородной связи, зависящего от ориентации и полученного из белковых структур высокого разрешения, статистических членов, аппроксимирующих вероятности зависящего от основной цепи типа аминокислоты и ротамера, и оценки энергий фолдинга. Далее, с использованием указанной функции, рассчитаны энергии димеризации каждого мутанта и исходного белка. Энергией димеризации считается разность между энергиями димера и двух отдельных мономеров.

2) Возбуждение свободной энергии с использованием плагина VMD AlaScan [90] в режиме хозяин-гость.

Для оценки свободной энергии в данном подходе используется Гамильтониан, зависящий от дополнительных параметров:

$$H(\Gamma, \lambda) = \sum_{i=1}^N \frac{p_i^2}{2m_i} + U(x_1, \dots, x_N, \lambda) \quad (5)$$

Где $\Gamma = (x_1, \dots, x_N, p_1, \dots, p_N)$ обозначает точку в фазовом пространстве системы из N частиц. Для фиксированного значения λ состояние равновесия системы при температуре T описывается распределением Больцмана-Гиббса:

$$p^{eq}(\Gamma, \lambda) = \frac{\exp(-\beta H(\Gamma, \lambda))}{\int d\Gamma' \exp(-\beta H(\Gamma', \lambda))} = \frac{1}{Q_\lambda} \exp(-\beta H(\Gamma, \lambda)) \quad (6)$$

где $\beta = \frac{1}{k_B T}$, где k_B – константа Больцмана, а зависимостью статистической суммы Q_λ от температуры можно пренебречь.

Разница между свободными энергиями состояний с $\lambda = 0, 1$ рассчитывается таким образом как отношение соответствующих статистических сумм:

$$\Delta A = -k_B T \ln \frac{Q_1}{Q_0} \quad (7)$$

Именно эта разница и характеризует различие в свободной энергии мутанта и исходного белка, которое мы хотим оценить.

λ - параметр, используемый для интерполяции между двумя различными физическими гамильтонианами, которые эффективно представляют системы с различным химическим составом. В наших расчетах выбранные аминокислотные остатки мутируют в аланин через последовательность промежуточных состояний, не имеющих самостоятельного физического смысла.

При расчёте возмущения свободной энергии используется соотношение в состоянии равновесия:

$$\exp(-\beta \Delta A) = \langle \exp(-\beta \Delta U) \rangle_0^{eq} \quad (8)$$

Где $\Delta U(\Gamma) = U(\Gamma, \lambda_1) - U(\Gamma, \lambda_0)$. Система моделируется в равновесном состоянии 0 (немутированный белок) с использованием молекулярной динамики. Тогда правая часть уравнения оценивается путём усреднения непосредственно по N микросостояниям.

$$\Delta A \approx -\frac{1}{\beta} \ln \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \exp[-\beta \Delta U(\Gamma_i)] \quad (9)$$

где $\Gamma_1, \dots, \Gamma_N$ - микросостояния, сгенерированные во время моделирования.

Таким образом описывается однонаправленный переход из состояния с $\lambda=0$ в состояние с $\lambda=1$. Если поменять направление, то равенство, описывающее возмущение свободной энергии, будет:

$$\exp(\beta\Delta A) = \langle \exp(\beta\Delta U) \rangle_0^{\text{eq}} \quad (10)$$

Изменение направления перехода необходимо для оценки свободной энергии по двунаправленным методам расчёта, сочетающим в себе выборки, полученные в обоих направлениях.

Отношение распределений значения изменения потенциальной энергии может быть получено по:

$$\frac{P_0(\Delta U)}{P_1(\Delta U)} = \exp(\beta(\Delta U - \Delta A)) \quad (11)$$

Где P_0 и P_1 – распределения, полученные из равновесных состояний с $\lambda=0$ и $\lambda=1$ соответственно.

Боковые цепи отобранных остатков постепенно по алгоритму алхимических трансформаций [91] трансформировались в группу $-\text{CH}_3$ с 20 промежуточными λ -состояниями, 1 нс проходов на состояние, проводились расчёты в прямом и обратном направлении для обеспечения лучшей сходимости.

Первый подход (молекулярный докинг) требует меньшего количества вычислительных ресурсов, однако не учитывает конформационные изменения белка при замене исходной аминокислоты на аланин и участие исходной аминокислоты в динамике белка. Также, молекулы воды не представлены явно в этой модели; таким образом, водородная связь, образованная конформационно ограниченной молекулой воды (предположительно стабилизирующая границу раздела), не будет описана. Предполагается, что аланиновая замена такой боковой цепи, образующей водородные связи, будет нейтральной, а не дестабилизирующей. И наоборот, потерю водородных связей при мутации на аланин можно компенсировать стабильным включением дополнительных молекул воды, уменьшая потерю энергии связи. В большинстве случаев такой подход оправдан, однако не в тех случаях, когда предполагается, что в белок-белковых

взаимодействиях могут играть большую роль конформационные изменения или водородные связи через мостиковые молекулы воды.

В качестве исходных структур для аланинового скрининга при помощи сервера Robetta было выбрано по пять структур из наиболее отличающихся кластеров, полученных в результате анализа молекулярно-динамических траекторий плагинном Clustering (<https://github.com/luisico/clustering>).

Результаты аланинового скрининга при помощи сервера Robetta аминокислот на поверхности контакта ацетилхолинэстеразы *Homo sapience* приведены на Рисунок 9, ацетилхолинэстеразы *Torpedo californica* на Рисунок 10, бутирилхолинэстеразы *Homo sapience* на Рисунок 11.

Как видно из анализа данных, большая часть аминокислот, участвующих в гидрофобных взаимодействиях между спиралями, оказывает больший стабилизирующий эффект на контакт, чем аланин, при этом этот эффект сохраняется от структуры к структуре. Наибольшие расхождения между структурами связаны с заменами гидрофильных остатков:

- Arg522 в ацетилхолинэстеразе *Homo sapience*, участвующего в создании солевого мостика
- His387 в ацетилхолинэстеразе *Homo sapience*, находящегося на петле, связанной со спиралью $\alpha 13$
- Gln374 в ацетилхолинэстеразе *Torpedo californica*, участвующий в образовании водородной связи
- Arg515 в ацетилхолинэстеразе *Torpedo californica*, образующий солевой мостик с петлёй второго мономера
- Glu367, Asp375, Asp 379, Lys528 в бутирилхолинэстеразе *Homo sapience*, образующие нестабильные водородные связи со вторым мономером

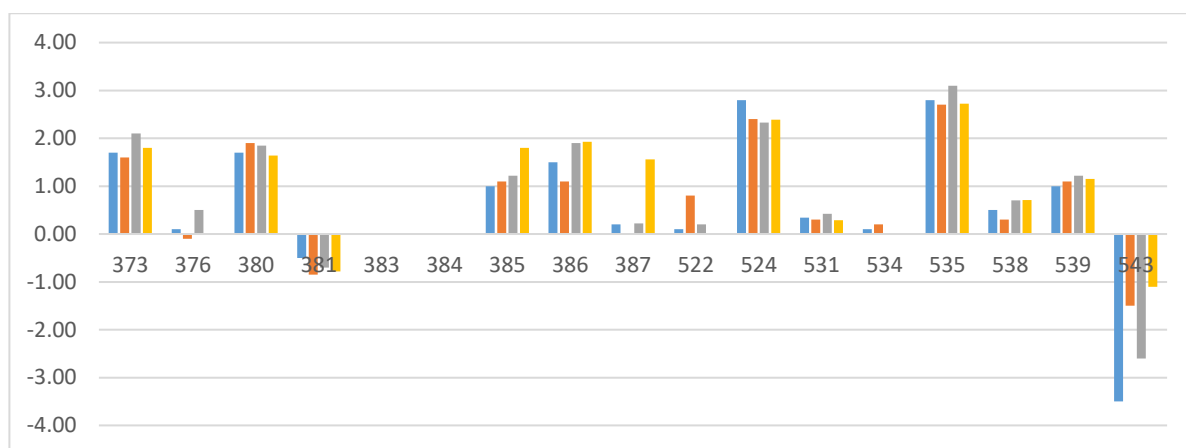


Рисунок 9. ΔG , ккал/моль, димеризации чАХЭ при поочередной замене аминокислотных остатков на аланин, докинг в приложении Robetta.

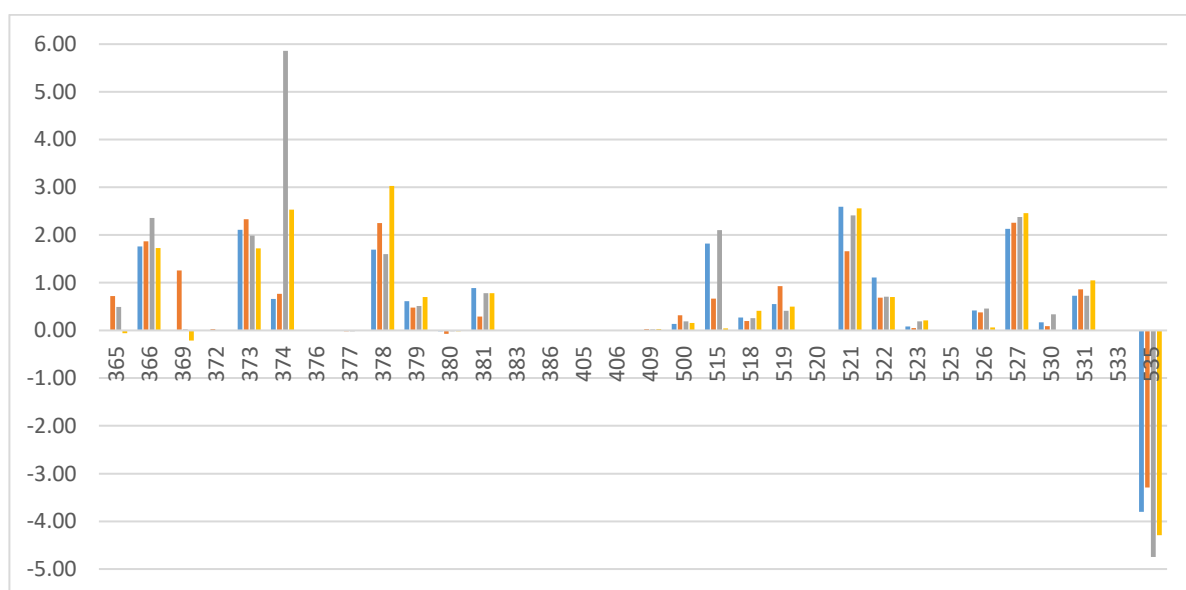


Рисунок 10. ΔG , ккал/моль, димеризации рАХЭ при поочередной замене аминокислотных остатков на аланин, докинг в приложении Robetta.

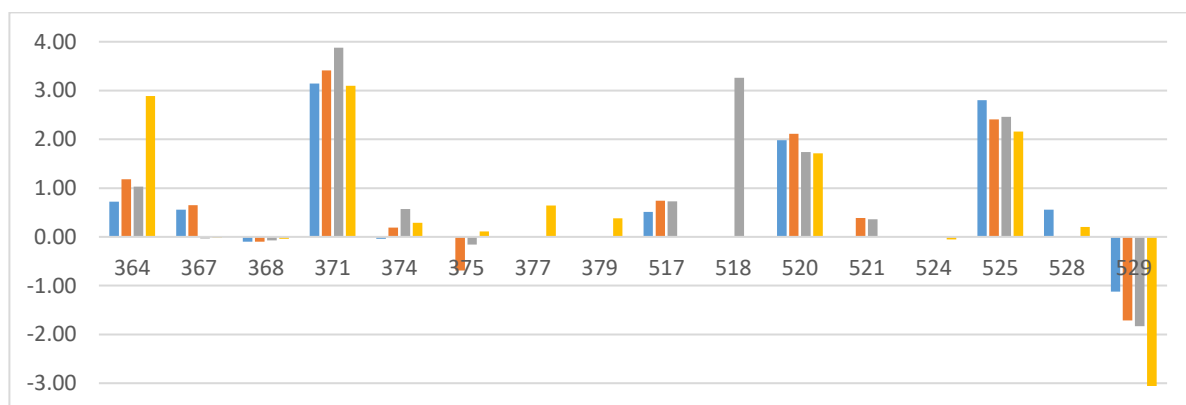


Рисунок 11 ΔG , ккал/моль, димеризации БХЭ при поочередной замене аминокислотных остатков на аланин, докинг в приложении Robetta.

Аланиновый скрининг по методу возбуждения свободной энергии произведён в режиме гость-хозяин. В этом режиме разница в энергии димеризации оценивается по термодинамическому циклу на Рисунок 12 по формуле

$$\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{димеризации}}^{\text{дикий тип}} - \Delta G_{\text{димеризации}}^{\text{мутант}} = \Delta G_{\text{мутации}}^{\text{два мономера}} - \Delta G_{\text{мутации}}^{\text{димер}} \quad (10)$$

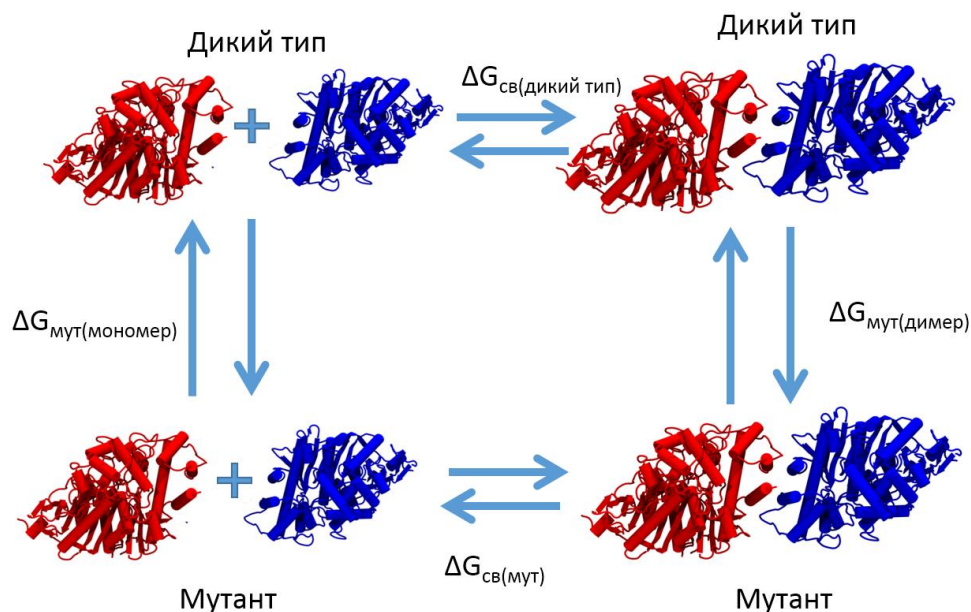


Рисунок 12. Термодинамический цикл аланинового скрининга по методу возбуждения свободной энергии в режиме гость-хозяин.

Результаты аланинового скрининга для чАХЭ приведены на Рисунок 13.

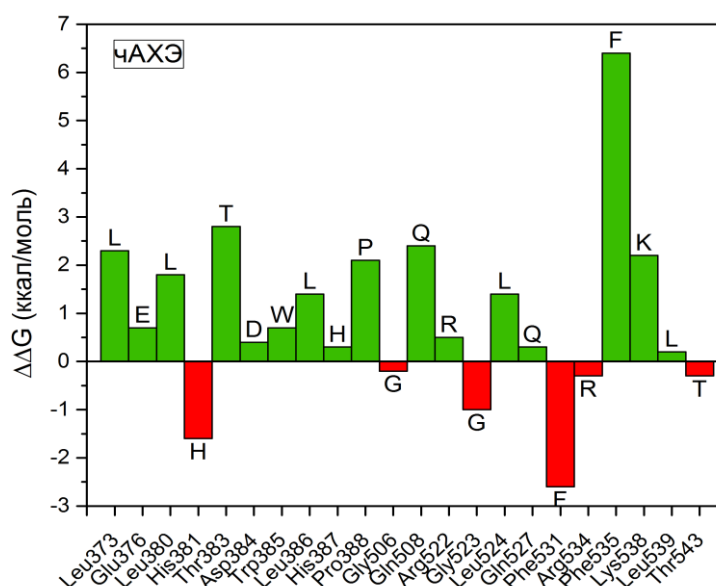


Рисунок 13. $\Delta\Delta G$, ккал/моль, димеризации чАХЭ при поочередной замене аминокислотных остатков на аланин по методу возбуждения свободной энергии.

По сравнению с данными, полученными при оценке свободной энергии на сервере Robetta, наиболее дестабилизирующим оказывается остаток Phe531.

Близость остатков His381 и Phe531 в пространстве позволяет предположить, что при протонировании His381 возможно π -катионное взаимодействие между их кольцами. Было проведено дополнительное молекулярно-динамическое моделирование и расчеты возмущения свободной энергии, при этом His381 был протонирован в одном мономере, а затем в обоих. В обоих случаях протонирование His381 не приводило к стабилизации димера. Напротив, в обоих случаях мутация этих остатков на аланин была еще более энергетически выгодной. В дополнение к кристаллическим структурам, в течение 100 нс молекулярно-динамического моделирования без наложенных ограничений, His381 и Phe531 оставались на близком расстоянии, но не образовывали устойчивые π -катионные взаимодействия: хотя кольца иногда были параллельными, они были слишком далеко, чтобы образовывать устойчивые взаимодействия друг с другом. В димере, где один или оба His381 протонированы, присутствие His381 приводит к попаданию молекул воды в высокогидрофобную среду. Это может объяснить дестабилизирующую роль этого остатка вместе с отталкиванием основных остатков гистидина друг от друга. При этом Phe531 препятствует отдалению His381 в отличие от менее объёмного аланина.

Для сравнения, в рАХЭ вместо His381 в том же положении находится Gln374. Таким образом, дестабилизирующего контакта не существует, и вклад Phe523 (аналог Phe531 в чАХЭ) в стабилизацию является благоприятным (Рисунок 14).

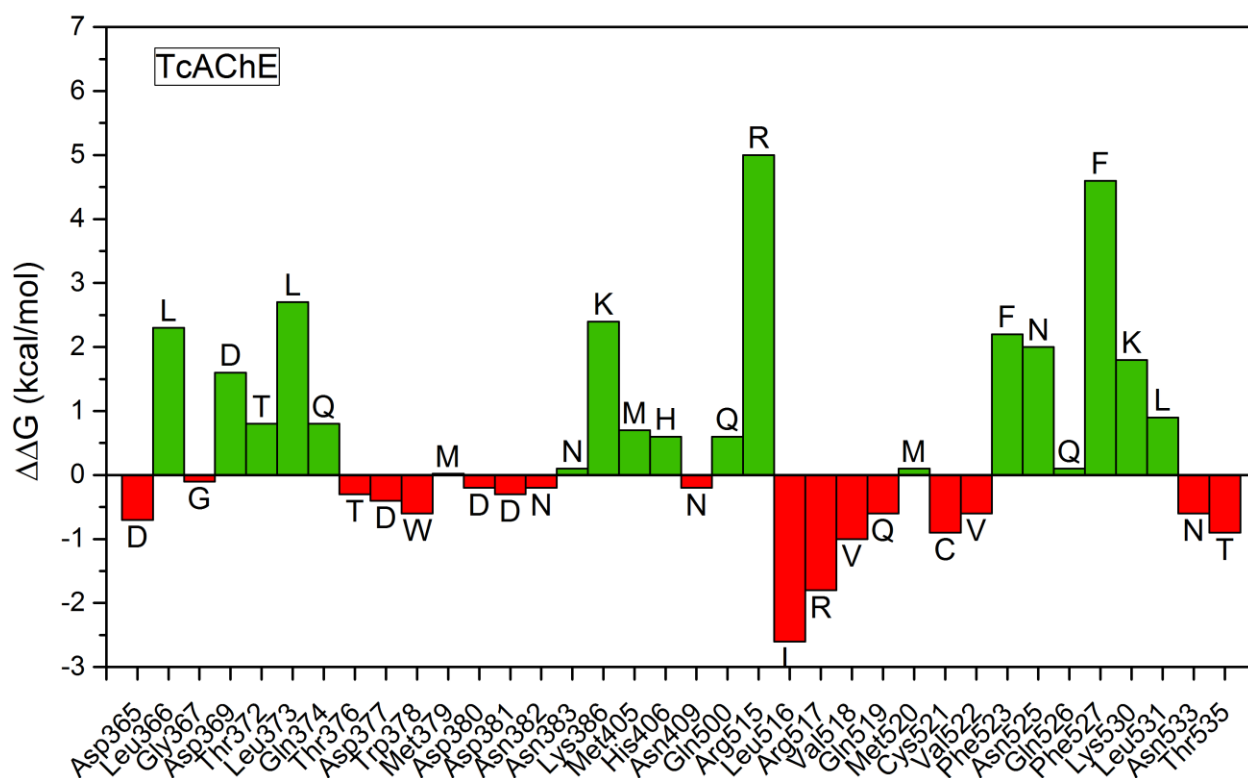


Рисунок 14. $\Delta\Delta G$, ккал/моль, димеризации рАХЭ при поочередной замене аминокислотных остатков на аланин по методу возбуждения свободной энергии.

Также по результатам аланинового скрининга для рАХЭ можно отметить, что гидрофильные остатки на альфа-спиралях контакта оказывают дестабилизирующий эффект, как и в случае чАХЭ. Одна из петель области контакта в рАХЭ является по большей части отрицательно заряженной, близость большого количества отрицательно заряженных остатков менее энергетически выгодна, чем поочерёдная их замена на аланин. Вторая петля содержит ряд основных остатков, образующих солевые мостики и сеть водородных связей с первой петлёй. Избыток положительно заряженных остатков оказывается менее энергетически выгодным, чем присутствие в петлях аланина вместо некоторых из них, однако наиболее вовлечённый в сеть водородных связей Arg515 оказывает наибольший стабилизирующий эффект из всех остатков рАХЭ.

БХЭ имеет меньше стабилизирующих аминокислот в петлях по сравнению с чАХЭ (Рисунок 15).

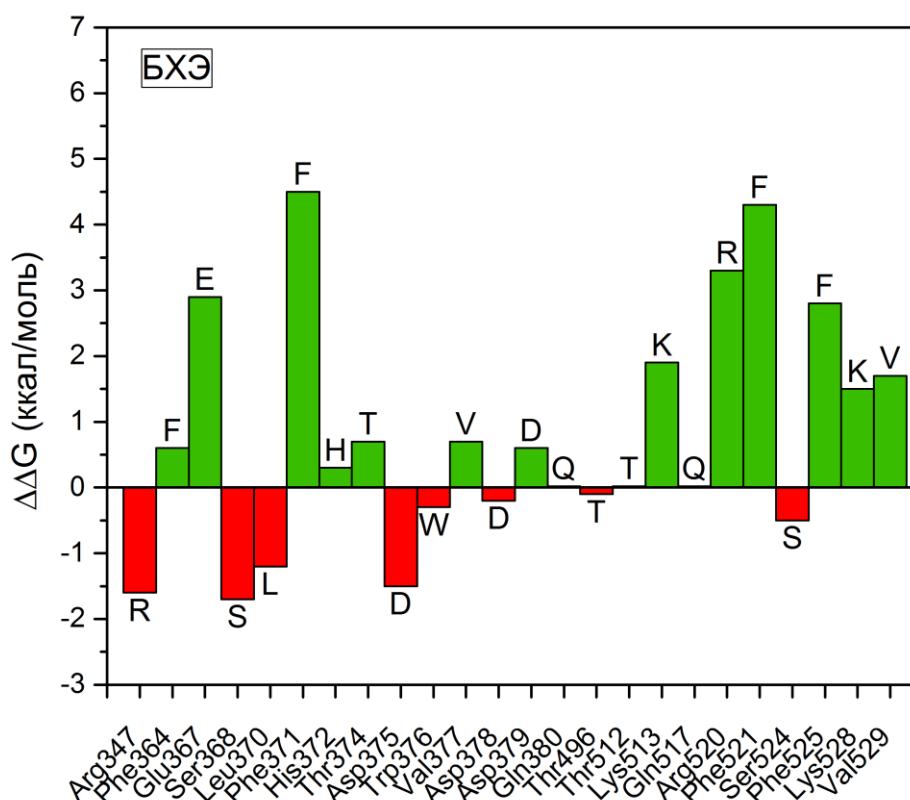


Рисунок 15. $\Delta\Delta G$, ккал/моль димеризации БХЭ при поочердной замене аминокислотных остатков на аланин по методу возбуждения свободной энергии.

Аминокислотами, неблагоприятными для димеризации БХЭ, являются:

- 1) полярные (например, серин) аминокислоты вместо гидрофобных в спиральных в области контакта
- 2) Asp375 и Asp378, которые отталкивают друг друга и дестабилизируют петлю.

His372 в БХЭ (аналог His381 в чАХЭ) образует водородную связь с Gln518 и более отдалён от границы раздела димеризации, поэтому он не обладает дестабилизирующим эффектом, наблюдаемым в чАХЭ.

Замена некоторых гидрофобных остатков на поверхности димеризации полярными остатками, в частности серином, приводит к притоку молекул воды в пространство между мономерами. Моделирование молекулярной динамики димера БХЭ демонстрирует большее количество молекул воды в контакте с гидрофобными аминокислотами спиралей, по сравнению с АХЭ.

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

3.6. Роль конформационных изменений при образовании узла из четырёх альфа спиралей

Для анализа конформационных изменений, сопровождающих процесс димеризации, был использован метод цепей Маркова [92]. 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 последующего перехода не зависит от истории переходов), и рассчитать вероятность переходов. В этой работе модель состояний Маркова (МСМ) была построена с помощью программного пакета PyEMMA [93].

Для построения состояний в модели Маркова необходимо выбрать характеристики системы, численное выражение которых будет характеризовать состояния. В качестве подобных характеристик возможно использование декартовых координат атомов белка (требует предварительного выравнивания кадров траектории), внутренних координат (межатомных расстояний, углов, торсионных углов), радиуса гирации [94], среднего квадратичного отклонения от исходного положения атомов белка (требует предварительного выравнивания кадров траектории) и других. В качестве таких характеристик 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 временной метод независимых компонент (вМНК) [95]. В основе данного метода лежит выбор независимых координат, представляющих собой линейные комбинации исходных координат, и

описывающих наиболее медленные переходы. Независимость координат достигается минимизацией общей информации между компонентами.

Метод вМНК является наиболее удачным выбором для поиска редких конформационных переходов за счёт низкой линейной зависимости получаемых координат друг от друга [96]. В нашей работе было использовано 20 вМНК, что достаточно для описания 92,5% данных.

Дискретизация состояний на микросостояния с заданными вМНК необходима для построения макросостояний. Мы использовали наиболее оптимальный [97] метод k-средних по алгоритму Вороного, при котором минимизируется суммарное квадратичное отклонение точек кластеров от центров этих кластеров. Центры кластеров – микросостояния системы (Рисунок 16). Метод кластеризации k-средних был использован для построения 100 микросостояний.

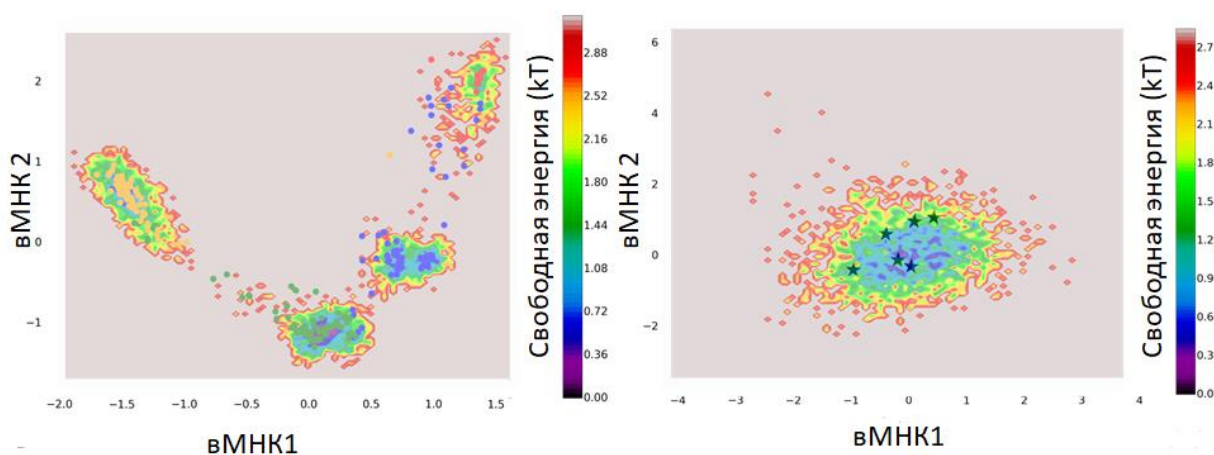


Рисунок 16. Поверхности свободной энергии в координатах вМНК1 и вМНК2 для БХЭ (слева) и ЧХЭ (справа). Звездами отмечены кристаллографические структуры ЧХЭ в координатах вМНК1 и вМНК2.

Центральным в построении MSM является расчёт матрицы вероятности перехода из одного макросостояния в другое, исходя из данных, полученных из молекулярно-динамических траекторий. MSM является решением уравнения

$$P(\tau)r_i = \lambda_i r_i \quad (11)$$

Где P – матрица вероятности перехода из одного макросостояния в другое, r_i – набор координат, соответствующих макросостояниям, λ_i – собственные значения оператора, которые затем трансформируются во времена релаксации системы.

Отдельной задачей является выбор времени задержки τ для построения модели состояний Маркова. Оно должно быть достаточно большим, чтобы переход из состояния $i(t)$ в состояние $j(t+\tau)$ не зависел от конформаций, предшествующих состоянию i . И достаточно маленьким, чтобы наиболее полно описать систему, выявив все возможные переходы. Если система является марковской при выбранном значении τ , то она является марковской и при большем значении τ . На этом основан метод выбора времени задержки с расчётом подразумеваемых временных шкал[98].

Время релаксации системы из одного состояния в другое может быть рассчитано по формуле

$$t_i(\tau) = -\frac{\tau}{\ln|\lambda_i(\tau)|} \quad (12)$$

Где λ_i - собственные значения оператора вероятности перехода.

Алгоритм выбора времени задержки с расчётом подразумеваемых временных шкал основан на расчёте наибольших t при наименьших λ , полученных как собственные значения оператора вероятности перехода при различных τ . Когда $t_i(\tau)$ достигают приблизительно постоянного значения для запаздываний τ , дискретизация в пространстве состояний достаточно хороша для описания динамики самых медленных процессов. Если не удаётся выбрать τ , при которых $t_i(\tau) = \text{const}$, значит недостаточно исходных данных молекулярной динамики. Обычно также ожидается, что запаздывания, для которых достигается приблизительно постоянное значение времени релаксации, значительно меньше, чем временные масштабы, представляющие интерес. Если это не так, также требуется увеличить количество данных молекулярно-динамических траекторий. В нашей работе время запаздывания было выбрано равным 1 нс.

Достаточность данных молекулярно-динамических траекторий также проверялась добавлением дополнительных траекторий после построения модели

Маркова. Если добавление дополнительных траекторий не приводило к изменению результатов, модель считалась построенной корректно. Стартовые конфигурации для траекторий выбирались из наименее заселённых макросостояний.

Для проверки модели на предмет независимости переходов между состояниями от предварительной истории переходов был проведён тест Чепмена-Колмогорова[99], суть которого сводится к тому, что вероятность перехода из i в j за k шагов

$$P_k = P_1^k \quad (13)$$

Где P_k – вероятность перехода из i в j за k шагов, P_1 – вероятность перехода из i в j за один шаг.

Тест Чепмена-Колмогорова (Рисунок 17) также позволяет выбрать количество макросостояний, при которых система сохраняет независимость вероятности перехода от предварительной истории.

Микросостояния были сгруппированы в 4 метастабильных макросостояния с помощью усиленного кластер-кластерного анализа по методу Перрона [100].

Пути перехода были рассчитаны с помощью теории дискретных путей перехода в формулировке модели состояния Маркова (МСМ). [101].

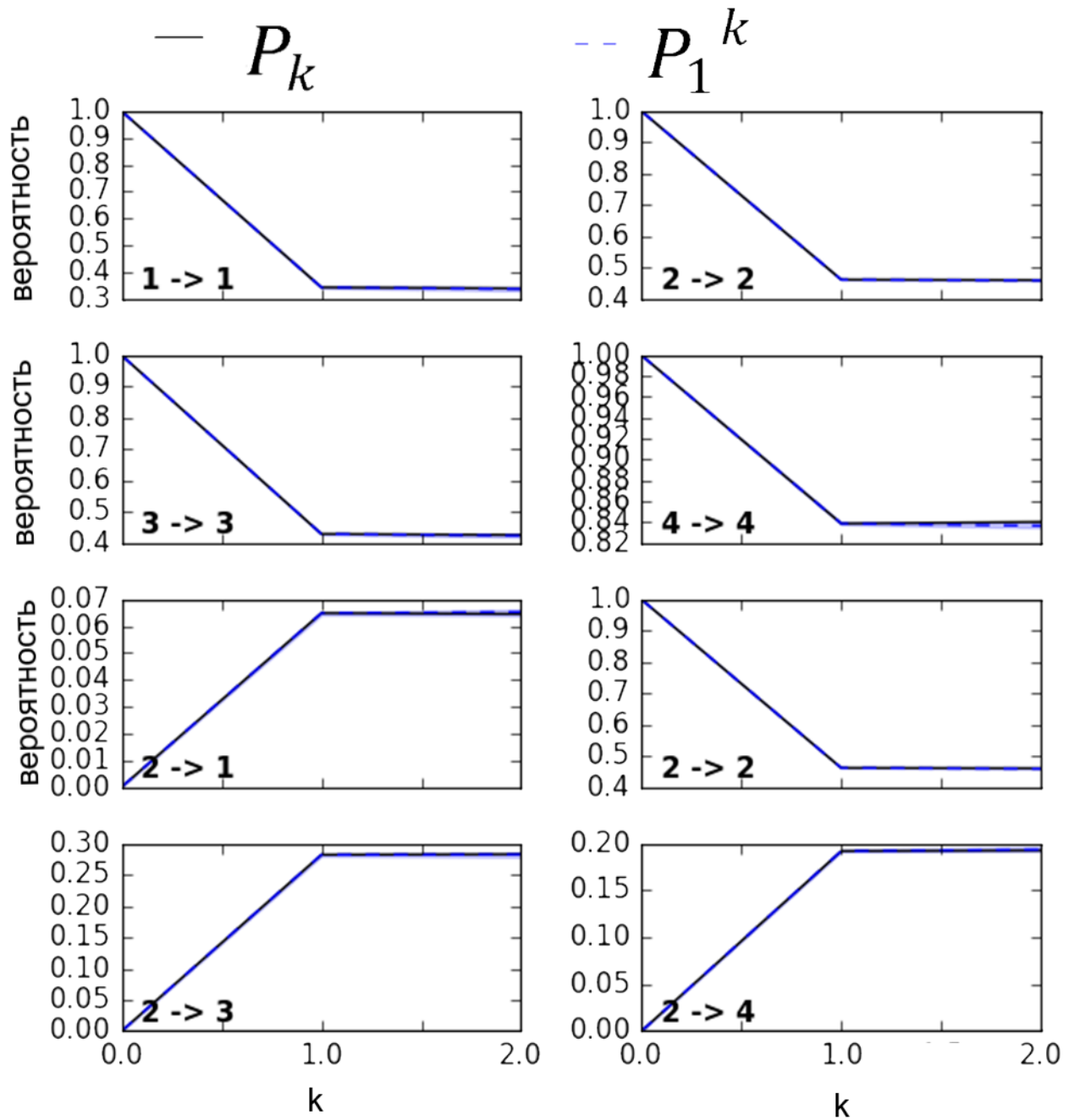


Рисунок 17. Результаты теста Колмогорова-Чепмена. Пунктирные линии – предполагаемые вероятности переходов (P_1^k). Сплошные линии – полученные при построении модели (P_k)

Выбор вМНК и последующий анализ поверхности свободной энергии в координатах вМНК1 и вМНК2 (энергии вычислены с помощью формулы

$$F_i = -\ln z_i \quad (14)$$

где z_i – количество структур с соответствующими значениями вМНК) для чАХЭ и мАХЭ показывает, что существует только одно макросостояние (Рисунок 16). Это

означает, что конфигурация петли между спиралями $\alpha 13$ - $\alpha 14$ стабильна. Для рАХЭ наблюдались два близких макросостояния (Рисунок 18). Нет значительного различия в формировании контактов с петлей от второго мономера.

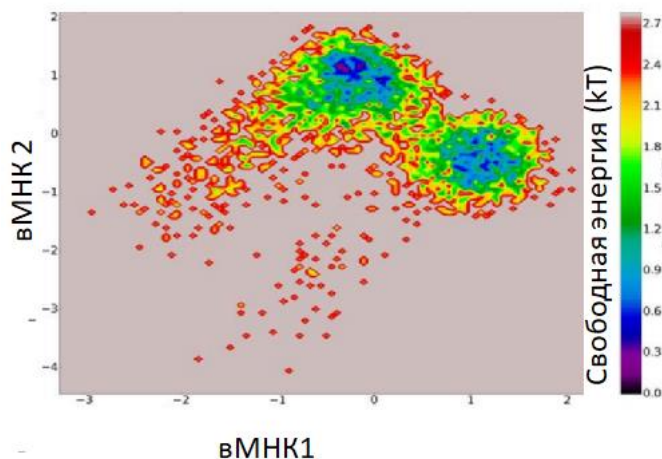


Рисунок 18. Поверхности свободной энергии в координатах VMHK1 и VMHK2 для рАХЭ.

Мы объединили 100 микросостояния БХЭ в 4 макросостояния (Рисунок 19), соответствующих различным конформациям петли между спиралями $\alpha 13$ - $\alpha 14$.

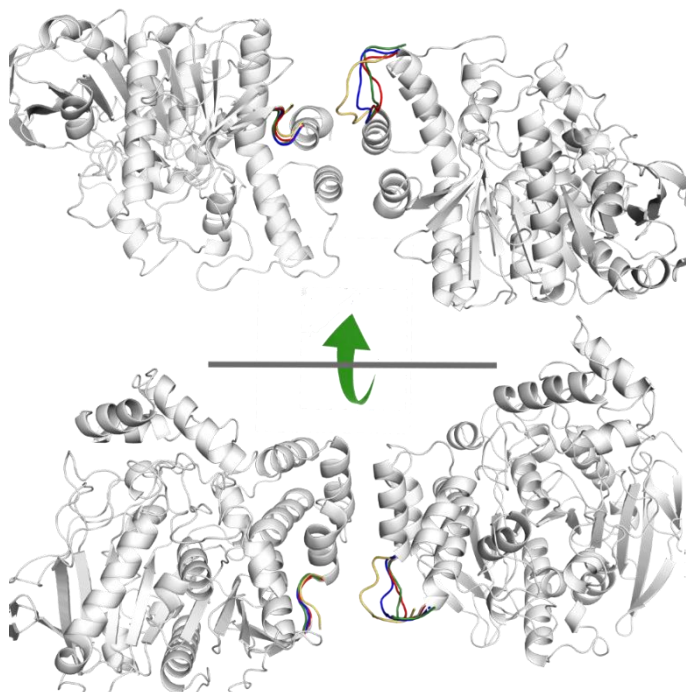


Рисунок 19. Конформации петли БХЭ между спиралями $\alpha 13$ - $\alpha 14$, соответствующие четырём макросостояниям.

На рисунке 19 показаны конформации петли, соответствующие четырем макросостояниям. Четвертая (жёлтая) конформация ближе ко второму мономеру димера, чем первая (красная), поэтому переход между этими состояниями соответствует переходу между более и менее стабилизированными димерами. «Красное» состояние стабилизируется водородной связью между Arg381 и Asp378 (это отчасти объясняет, почему аланин более предпочтителен, чем Asp378), а «желтое» состояние стабилизируется водородной связью между Trp376 и Gln380.

Димеры из желтого кластера имеют угол между α -спиралями от разных мономеров около $6,5 \pm 3^\circ$, в то время как димеры из красного кластера имеют угол между α -спиралями от разных мономеров около $14 \pm 2^\circ$. Это говорит о том, что взаимодействия между мономерами в желтом кластере стабилизируют момеры в димерах в лучшем положении для гидрофобных взаимодействий.

Переход между крайними состояниями возможен тремя различными путями (Рисунок 20): через две промежуточные конформации или только через какую-либо

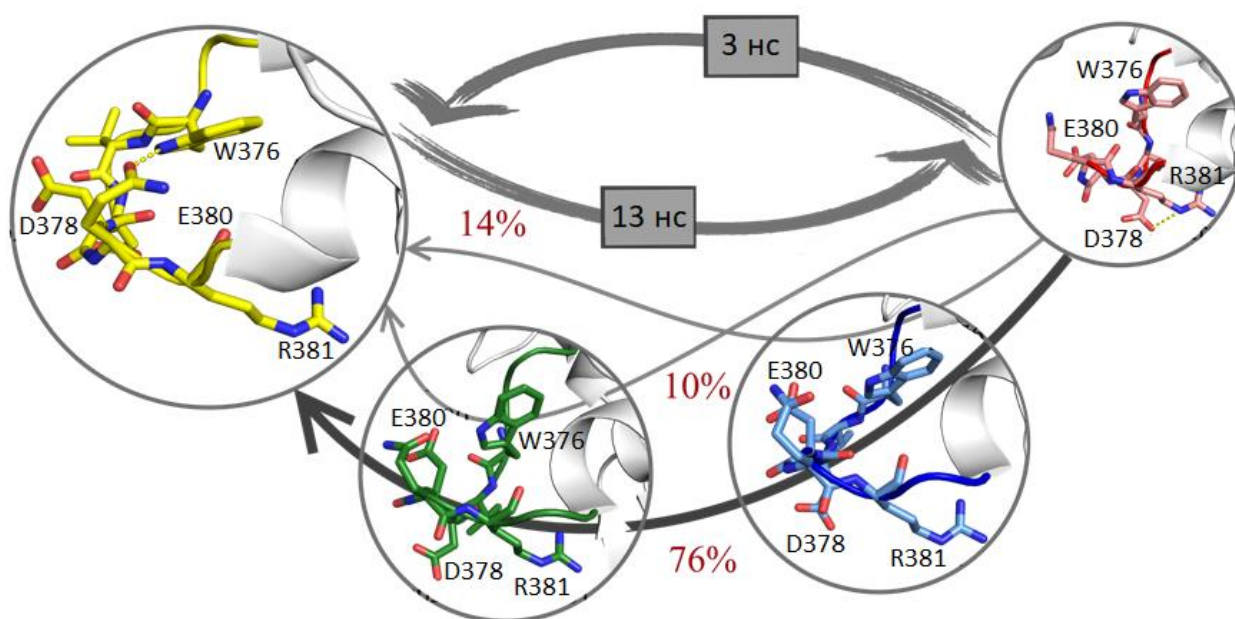


Рисунок 20. Строение конформаций БХЭ, времена перехода из крайних макросостояний друг в друга, вероятность использования пути перехода через промежуточные макросостояния.

одну из них. 76% переходов происходят через две промежуточные конформации, что соответствует последовательному развороту W376, образованию водородной связи W376-E380 и развороту D378 в сторону второго мономера.

Времена и пути перехода рассчитаны исходя из теории пути перехода [102]. В данной теории выбирают начальное А и конечное В состояние (состояние из красного кластера нами рассматривалось как начальное, а из жёлтого как конечное). Рассматривается вероятность q_i того, что из микросостояния i траектория эволюционирует в А, тогда вероятность эволюции траектории из состояния i в состояние В:

$$\pi_i = (1 - q_i)p_i q_i \quad (15)$$

Где p_i – вероятность нахождения системы в состоянии i , q_i – вероятность того, что из микросостояния i траектория эволюционирует в А

А вероятность того, что траектория окажется последовательно в состояниях i и j :

$$\pi_{ij} = (1 - q_i)p_i q_j t_{ij} \quad (16)$$

где p_i – вероятность нахождения системы в состоянии i , а t_{ij} – вероятность перехода системы из состояния i в состояние j .

Назовём потоком химической реакции через состояния i и j :

$$F_{ij} = \pi_{ij} - \pi_{ji} = p_i t_{ij} (q_j - q_i) \quad (17)$$

где p_i – вероятность нахождения системы в состоянии i , а t_{ij} – вероятность перехода системы из состояния i в состояние j , q_i – вероятность того, что из микросостояния i траектория эволюционирует в А, q_j – вероятность того, что из микросостояния j траектория эволюционирует в А

Тогда константой скорости реакции перехода из одной конформации в другую, является отношение

$$k_{AB} = \frac{\sum_{i \in A, j \notin A} F_{ij}}{\sum_i \pi_i} \quad (18)$$

где F_{ij} – поток химической реакции через состояния i и j , π_i – вероятность эволюции траектории из состояния i в состояние В

Тогда времена перехода равны k_{AB}^{-1}

Времена перехода из первой в четвёртую конформацию и обратно различаются на порядок, что означает большую стабильность четвёртой

конформации – благоприятной для димеризации, константа равновесия перехода из конформации А в конформацию В равна 4.

В кристаллических структурах БХЭ петли $\alpha 13$ - $\alpha 14$ не разрешены совсем или разрешены с низкой точностью; средние В-факторы атомов в петлях отличаются от средних В-факторов всех атомов в белке более чем на 2 сигма, что подтверждает существование этой петли в нескольких конформациях.

3.7. Комбинированный метод зонтичной выборки и алгоритма перекрещивающихся распределений для расчёта энергии димеризации

Для расчёта энергии димеризации был применён метод зонтичной выборки (МЗВ) [103]. В МЗВ реакционный путь разбивается на набор копий системы с различными значениями выбранной координаты реакции (ξ), для каждой из которых отдельно рассчитываются МД траектории, таким образом эффективно распределяя вычисления на количество процессоров, равное количеству копий. При этом в каждом i -ом окне с центром в ξ_i^{ref} на значение координаты реакции накладывается ограничивающий гармонический потенциал с заданной константой упругости (K):

$$\omega_i(\xi) = \frac{K}{2}(\xi - \xi_i^{ref})^2 \quad (19)$$

где ξ_i^{ref} – центр i -ого окна, ξ – координата реакции, K – константа упругости

Профили свободной энергии для каждого окна совмещаются методом взвешенных гистограмм [104], уменьшающего статистические ошибки при расчёте глобального распределения. В рамках этого метода глобальное распределение рассчитывается как средневзвешенное распределений значения координаты реакции по окнам, а значение свободной энергии F_i рассчитывается, исходя из вероятности обнаружить систему с той или иной координатой реакции:

$$e^{-\beta F_i} = \int P^u(\xi) e^{-\beta \omega_i(\xi)} d\xi \quad (20)$$

где $\omega_i(\xi)$ – ограничивающий гармонический потенциал, $P^u(\xi)$ – плотность вероятности обнаружить систему с той или иной координатой реакции, $\beta = 1/k_B T$ (k_B – постоянная Больцмана).

Однако при применении данного метода необходим расчёт продолжительных траекторий для каждой копии для лучшего обхождения конфигурационного пространства и преодоления возможных потенциальных барьеров. При этом вопрос о достаточности продолжительности траекторий всегда остаётся открытым.

Для преодоления этой проблемы применяется метод зонтичной выборки с обменом координатами между копиями системы периодически через выбранное число шагов интегрирования. Координаты для обмена могут быть получены при других температурах или в окне с другим значением стартовой координаты реакции.

Расчёт профиля свободной энергии димеризации (Рисунок 21) был проведён методом зонтичной выборки с обменом гамильтонианами. В роли коллективной переменной было выбрано расстояние между центрами масс мономеров. Реакционный путь был разбит на 124 окна. Обмен координатами между окнами происходил каждые 100 фс. Для каждого белка было рассчитано по 15 нс молекулярной динамики каждой копии системы с $k=25\text{ ккал/моль}\cdot\text{\AA}^2$. Начальные геометрии для каждого окна траектории были получены в предварительных расчётах методом направленной молекулярной динамики.

В процессе диссоциации димера чАХЭ угол между спиралями оставался менее 20° до уменьшения расстояния между мономерами на $4,5\text{ \AA}$. Это позволяет поддерживать непрерывные гидрофобные контакты как можно дольше и удерживать петли близко друг к другу. Для БХЭ наблюдается противоположная ситуация, контакты между петлями теряются в начале процесса диссоциации за счёт увеличения угла между спиралями, в то время как π - π и π -катионные контакты в середине спиралей сохраняются. Между спиралями со стороны С-конца проникают молекулы воды, разрушая гидрофобные взаимодействия.

Это подтверждает наше предположение, что замена гидрофобных аминокислот на границе димеризации чАХЭ на полярные остатки в БХЭ снижает стабильность димера. Таким образом, электростатические взаимодействия не вносят значительного вклада в димеризацию. Это согласуется с ранними

экспериментальными наблюдениями о том, что ионная сила раствора (в диапазоне μ от 0,001 до 1) не влияет на взаимопревращение между мономерной и бездисульфидной димерными формами БХЭ [105].

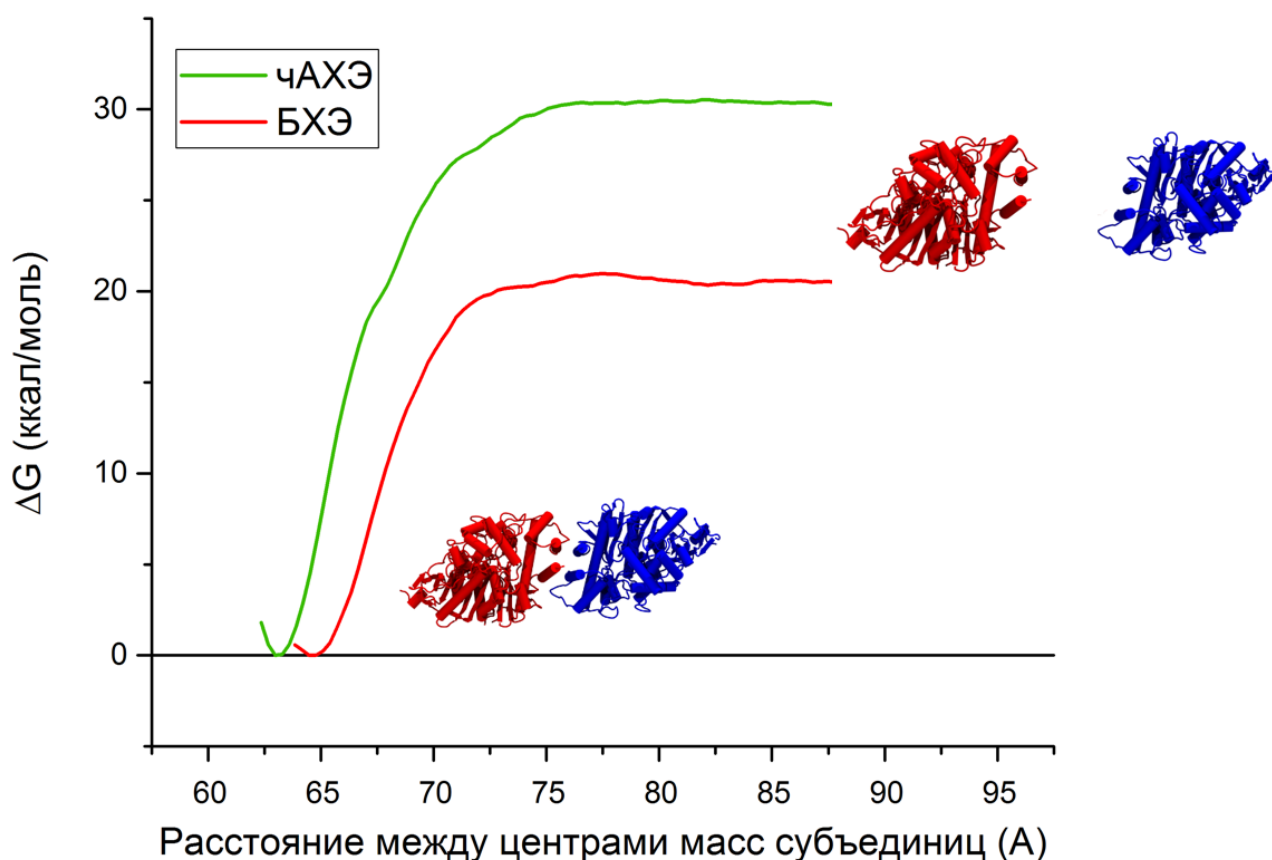


Рисунок 21. Профиль свободной энергии диссоциации чАХЭ и БХЭ.

ΔG° димеризации АХЭ составила -26.4 ккал/моль, а для БХЭ существенно меньше -15.5 ккал/моль.

3.8. Влияние гликозилирования на формирование четвертичной структуры бутирилхолинэстеразы

Гликозилирование является одной из наиболее распространенных посттрансляционных модификаций (> 50% всех белков гликозилированы). Его важность обусловлена тем, что гликозилирование служит для модуляции различных биохимических процессов, как на клеточном, так и на молекулярном уровне. Гликозилирование может уменьшить структурную подвижность белка не только на участках вблизи гликозилированных остатков, но также и на участках, удаленных от сайта гликозилирования. При этом на первичную и вторичную структуру гликозилирование не оказывает влияния [106]. Изменение структурной

подвижности белковой молекулы в свою очередь влияет на каталитические свойства, формирование четвертичной структуры и термостабильность белковой молекулы.

Для бутирилхолинэстеразы известно два типа димеров в кристаллографических структурах. Помимо параллельного узла из четырёх альфа-спиралей (угол между осями спиралей 18), при неполном гликозилировании образуется димер с углом между осями спиралей 60.

На рисунках 22 и 23 приведены сайты кристаллографических контактов в кристаллах, образованных полностью гликозилированным и неполностью гликозилированным белком.

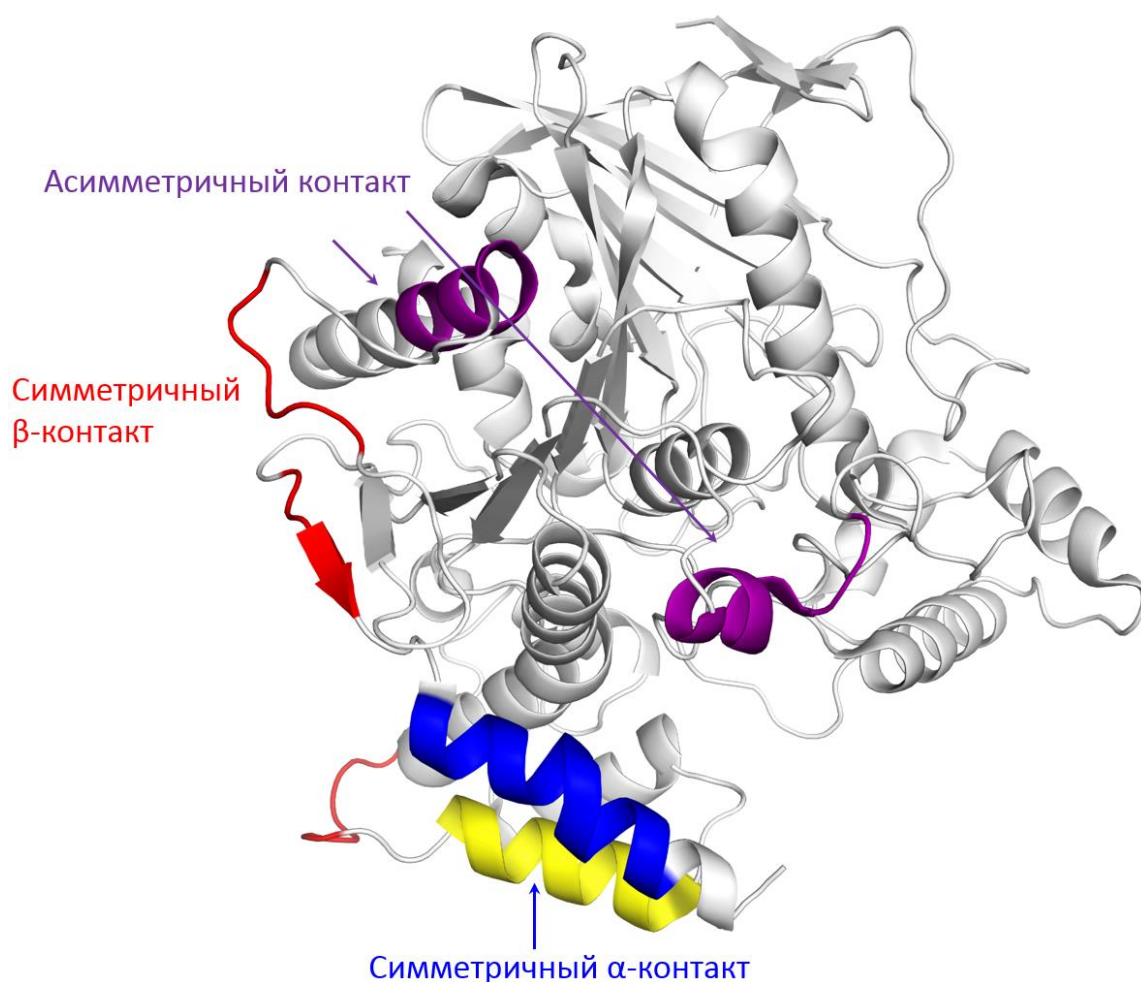


Рисунок 22. Сайты кристаллографических контактов дегликозилированной БХЭ (PDBID 1P0I).

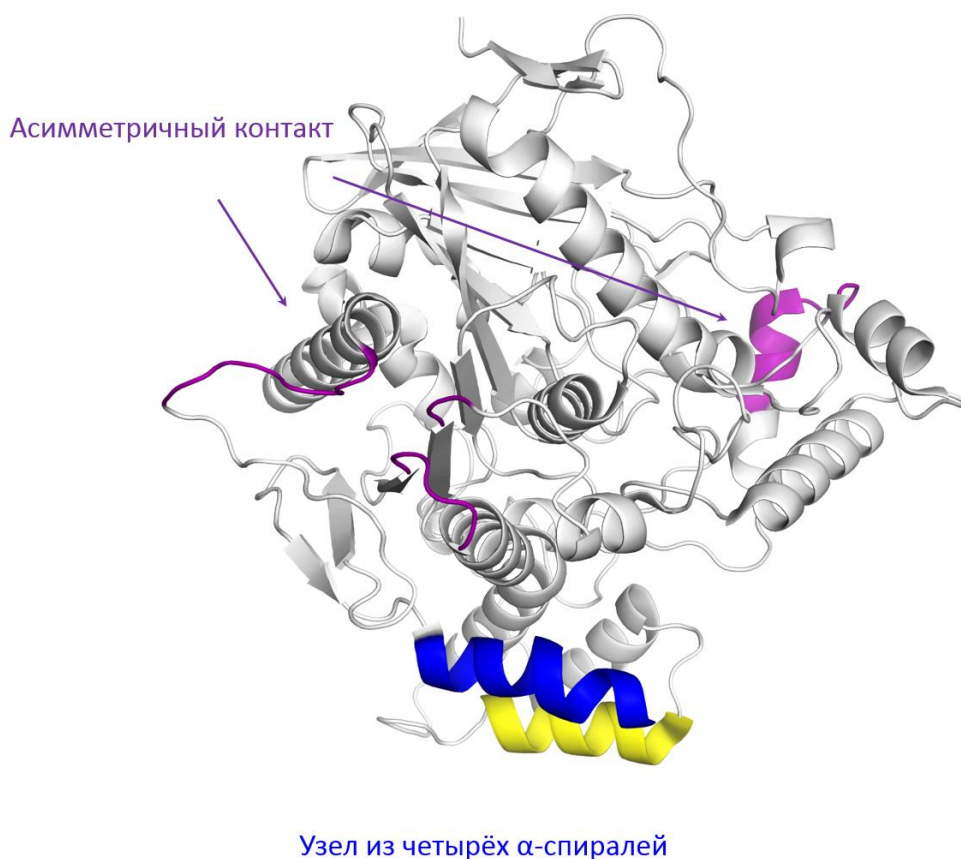


Рисунок 23. Сайты кристаллографических контактов полностью гликозилированной БХЭ (PDB ID 4AQD).

Отсутствие гликанов увеличивает количество кристаллографических контактов, упаковка кристалла оказывается более плотной (пространственная группа симметрии $P4_212$), чем в кристалле, образованном полностью гликозилированным белком (пространственная группа симметрии $P212121$). Помимо свёрнутого контакта между альфа-спиралями, образуется симметричный контакт между β -листами и асимметричный контакт.

Нами проведён анализ гликозилирования по всем возможным сайтам как для структуры с неполным гликозилированием (2PM8), так и для трёх полностью гликозилированных кристаллографических структур (4AQD, 4TPK, 4XII) (Таблица 15).

Таблица 15. Гликозилирование БХЭ

		17	57	106	241	256	341	455	481	486 (485)
2PM8	A	del	NAG	NAG	0	0	NAG- NAG	del	del	del(NA G)
	B	del	0	NAG	0	0	0	del	del	del (0)
4AQD	A	NAG- NAG	NAG- NAG- FUC	NAG- NAG	NAG- NAG- FUC	0	NAG	0	NAG- NAG- MAN	NAG- NAG- FUC
	B	NAG	NAG	NAG	NAG- NAG- FUC	NAG- NAG- FUC	NAG	0	NAG	0
4TPK	A	NAG	NAG- NAG-	NAG- NAG	NAG- FUC	0	NAG- NAG- FUC	0	NAG- NAG	NAG- NAG- FUC
	B	NAG	NAG	NAG- NAG	NAG- NAG- FUC	NAG	NAG	0	NAG	0
4XII	A	NAG	NAG- NAG	NAG- NAG	NAG- NAG- FUC	0	NAG- FUC	NAG	NAG- NAG	NAG- NAG- FUC
	B	NAG	NAG	NAG	NAG- FUC	NAG	NAG	NAG	NAG	0

Гликозилирование в структурах, полученных с сохранением всех сайтов, различается (ср. гликозилирование 4AQD, 4TPK, 4XII), однако сохраняется связь с тремя углеводами у Asn486 (Рисунок 24). В отличие от искусственного сайта гликозилирования Asn485, Asn486 находится непосредственно в области одного из контактов в непараллельном димере. Нами была произведена замена Gln486Asn Asn485Asp с восстановлением исходного сайта гликозилирования в

дегликозилированном димере 3O9M. Углеводные остатки добавлены при помощи надстройки [107] с использованием пакета Psfgen, входящего в состав VMD [82].

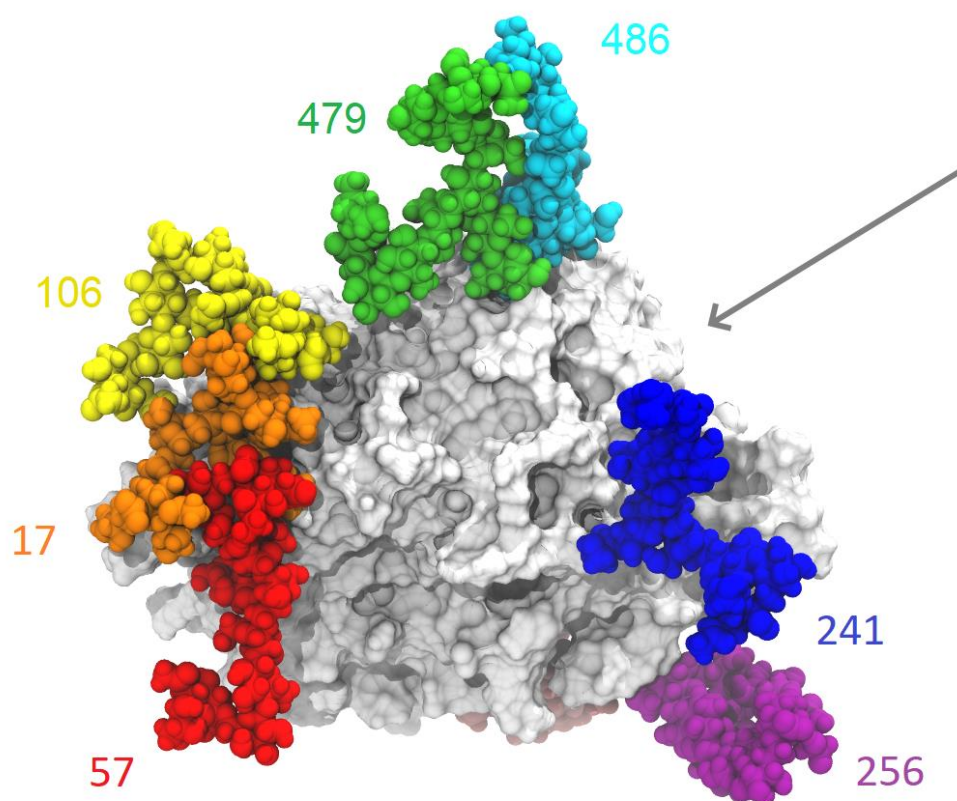


Рисунок 24. Гликозилирование БХЭ.

За первые 20 нс молекулярной динамики данной димерной гликозилированной структуры расстояние между мономерами увеличивается на 3 Å, что приводит к уменьшению электростатического взаимодействия и может являться причиной того, что такой контакт не образуется при полном гликозилировании.

Также, предположение о том, что в случае БХЭ гликозилирование влияет на формирование кристаллографических контактов, высказано в статье, в которой впервые была получена кристаллографическая структура полностью гликозилированной бутирилхолинэстеразы [20].

Молекулярное моделирование мономера БХЭ с добавленным тетрамеризационным доменом [108] продемонстрировало, что поведение тетрамеризационного домена сильно зависит от гликоформы БХЭ. В случае

отсутствия гликозилирования по сайту 241, тетрамеризационный домен переходит в конформацию, в которой невозможна тетрамеризация, и сохраняет её на большей части траектории. Тогда как тетрамеризационный домен гликозилированного по сайту 241 мономера остаётся в благоприятной для тетрамеризации конформации на протяжении 100 нс.

Таким образом, гликозилирование БХЭ действительно влияет на возможность формирования контактов и наличие или отсутствие углеводных остатков может стабилизировать тот или иной контакт. В структуре АХЭ отсутствует сайт гликозилирования, гомологичный Asn241 БХЭ, таким образом, образование димера и тетрамера АХЭ происходит без дополнительной стабилизации гликолями, что говорит о большей стабильности димеров АХЭ по сравнению с димерами БХЭ.

3.9. Особенности строения димера нейролигина 3

Вновь полученная структура нейролигина 3 по геометрическим критериям соответствует димеру из четырёх α -спиралей. Изменение площади гидрофобных контактов оказывается средним в наборе исследуемых белков и в процессе молекулярно-динамической траектории меняется незначительно.

Нейролигин 3 не имеет солевых мостиков между спиральями, образующими контакт, однако мостики присутствуют на петлях и оказываются достаточно устойчивыми на МД траектории (присутствуют на 90% кадрах траектории).

Нами проанализированы полярные энергии связывания НЛГ3 для различных структур по приведённому ранее протоколу. Результаты представлены в таблицах 16 и 17.

Таблица 16. Полярная энергия связывания в различных структурах НЛГЗ, полученных в ходе молекулярной динамики

нс	Число солевых мостиков между петлями	Энергия десольватации, кДж/моль	Электростатический вклад в энергию связывания, кДж/моль	Полярная энергия связывания, кДж/моль
11,25	0	11	9	31
51	1	12	2	26
69,02	2	25	-34	16

Таблица 17. Вклад различных участков белка в электростатическую энергию связывания в различных структурах НЛГЗ, полученных в ходе молекулярной динамики

нс	Число солевых мостиков между петлями	спираль $\alpha 13$	петля между $\alpha 13$ и $\alpha 14$	доп. петля	петля между $\alpha 18$ и $\beta 14$	спираль $\alpha 18$
11,25	0	0	-1	0	0	1
51	1	0	-1	-1	0	2
69,02	2	-5	-9	-7	0	2

Таким образом, вклад петель в любом случае оказывается отрицательным, однако в случае наличия солевого мостика контакт между петлями благоприятствует димеризации в максимальной степени.

В качестве общей особенности неройлигинов и нейролигина 3 в частности следует отметить, что наибольший вклад в электростатическую энергию связывания вносят дополнительные петли, не связанные напрямую со спиралью, образующими контакт (остатки Asp446, Arg450, Arg553) (рисунки 25 и 26).

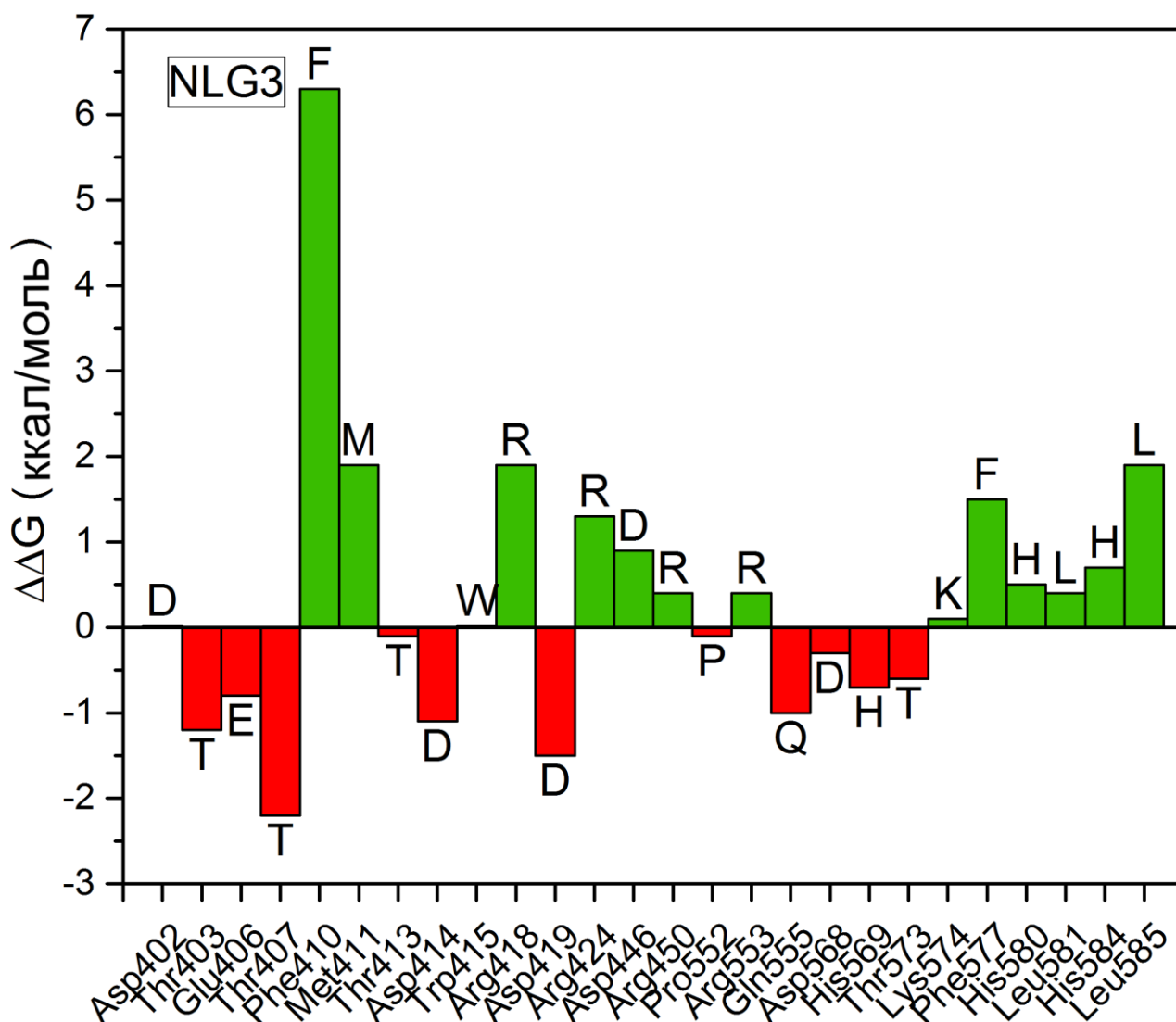


Рисунок 25. $\Delta\Delta G$, ккал/моль, димеризации НЛГ3 при поочередной замене аминокислотных остатков на аланин по методу возбуждения свободной энергии.

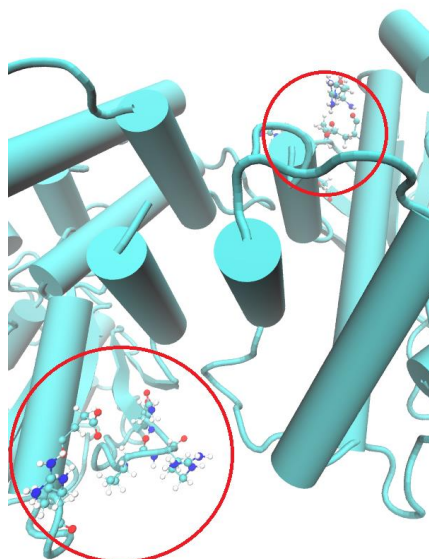


Рисунок 26. Дополнительные петли, участвующие в стабилизации димера НЛГЗ.

При *in silico* аланиновом скрининге по методу возбуждения свободной энергии в целом, сохраняются закономерности образования узла из четырёх альфа-спиралей, которые были выявлены для холинэстераз (Рисунок 25): формирование контакта стабилизируют полярные электростатические взаимодействия на петлях в районе контакта и гидрофобные взаимодействия между альфа-спиралями двух мономеров. Наоборот, дестабилизируют контакт гидрофильные остатки между спиралями и остатки на петлях, препятствующие образованию более сильного контакта. Так, Asp414 и Asp419 при поочерёдной замене на аланин оказываются в более выгодном положении для взаимодействия с Arg553.

При использовании сервера Robetta и скоринг функции для оценки различия свободной энергии связывания между исходным белком и белком с поочерёдно мутированными на аланин остатками частично воспроизводится результат аланинового скрининга по методу возбуждения свободной энергии (Рисунок 27), однако не учитываются:

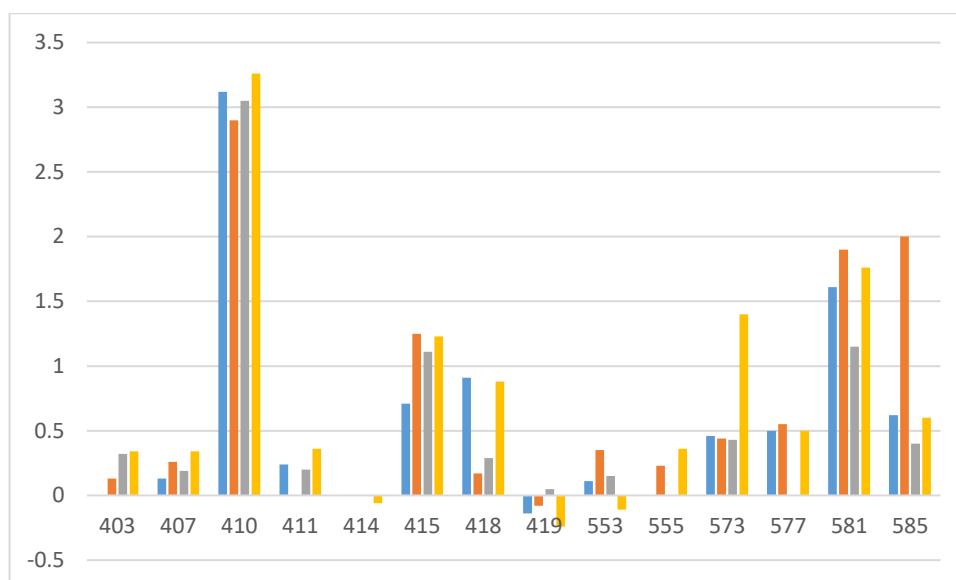


Рисунок 27. $\Delta\Delta G$, ккал/моль, димеризации НЛГ3 при поочередной замене аминокислотных остатков на аланин, докинг в приложении Robetta.

- взаимодействия между аминокислотными остатками, представляющие собой водородные связи через молекулу воды
- дестабилизация контакта за счёт внедрения молекул воды между спиральями в районе гидрофильных остатков
- различные положения заряженных остатков, приводящие к различной степени влияния на энергию связывания (например, см. Arg418 на Рисунок 27)

Для анализа конформационных изменений, сопровождающих процесс димеризации, был также использован метод цепей Маркова [92]. В качестве характеристических координат нами были выбраны ϕ , ψ и χ торсионные углы 413-420 аминокислотных остатков. Петля имеет единственную стабильную конформацию, как и в случае всех изученных холинэстераз. Так же единственную стабильную конформацию имеют дополнительные петли.

Таким образом, димер нейрוליгина 3 как с точки зрения структуры, так и с точки зрения энергетических вкладов и конформационной стабильности схож с димерами ацетилхолинэстеразы различных видов.

Глава 4. Особенности взаимодействия холинэстераз с ривастигмином в зависимости от исходной структуры белка: влияние различий между холинэстеразами различных видов и конформационных изменений

Известно также, что, хотя гидролиз ацетилхолина протекает одинаково быстро во всех известных холинэстеразах [47], существует два субстрата, для которых известны различия в кинетике взаимодействия с холинэстеразами различных видов: фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) и ривастигмин. Изучение структурно-динамических особенностей взаимодействия этих субстратов с холинэстеразами позволит пролить свет на механизмы регуляции ферментативного катализа.

4.1. Механизм взаимодействия АХЭ с фенилметилсульфонилфторидом: экспериментальные данные и молекулярная динамика

Как фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ), так и бензилсульфонилфторид (БСФ) (Рисунок 28) – потенциальные ковалентные ингибиторы холинэстеразы. Сульфонильная группа ФМСФ и БСФ стерически аналогична карбонильной группе ацетилхолина в переходном состоянии в процессе гидролиза АХЭ. Гидроксильная группа Ser200 вступает во взаимодействие с сульфонильной группой как нуклеофил, что приводит к необратимому сульфированию АХЭ.

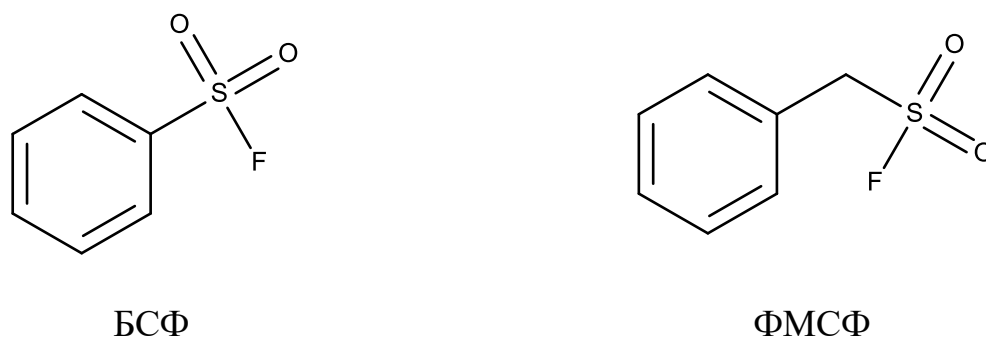


Рисунок 28. Структуры БСФ и ФМСФ.

Однако, несмотря на различие всего на одну метиленовую группу, данные вещества в разной степени ингибируют АХЭ рыб и млекопитающих (Рисунок 29, Таблица 18) [109].

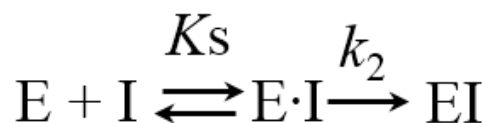


Рисунок 29. Кинетическая схема ингибирования ХЭ сульфонилфторидами.

Таблица 18. Кинетические константы ингибирования ХЭ сульфонилфторидами

	мАХЭ		рАХЭ	
	K_1 (ммоль)	k_2 (мин ⁻¹)	K_1 (ммоль)	k_2 (мин ⁻¹)
ФМСФ	0,7	0,6	-	-
БСФ	2	0,1	4	0,06

Для того чтобы выявить, какие различия в структуре АХЭ приводят к различиям в кинетике связывания сульфонилфторидов были изучены динамические свойства холинэстераз [110]. На основе трёхмерных кристаллографических структур рАХЭ и мАХЭ была проведена молекулярная динамика в течение 20 нс. Хотя трёхмерные структуры практически идентичны, молекулярное моделирование чётко показывает, что мАХЭ значительно более гибок, чем рАХЭ. Среднее значение среднеквадратичного отклонения для атомов основной цепи в мАХЭ составляет ~1,3 Å по сравнению с ~1,0 Å в рАХЭ. Почти во всей последовательности остатки мАХЭ являются более гибкими, чем остатки рАХЭ. Одна из наиболее гибких областей находится вокруг вставленной последовательности PPGG в мАХЭ (P258-P259-G260-G261).

В дальнейшем был проведён докинг без гибких остатков в активные сайты рАХЭ и мАХЭ обоих ингибиторов. Не было получено ни одной структуры с расстоянием между атомом серы и гидроксильной группой серина каталитической триады, достаточным для нуклеофильной атаки, однако в процессе последующей

молекулярной динамики результаты согласуются с экспериментом: БСФ достигает серина каталитической триады обоих белков, а ФМСФ только S203 мАХЭ.

4.2. Механизм взаимодействия АХЭ с ривастигмином

Ривастигмин ((–)-м-[(S)-1-(диметиламино) этил] фенилэтилметил карбамат) является одним из немногих фармакологических средств с доказанной эффективностью для симптоматического лечения болезни Альцгеймера [111]). По механизму действия это медленный субстрат АХЭ. Его гидролиз протекает в две стадии: карбамилирования с образованием карбамоилфермента, и последующего декарбамилирования, которая протекает настолько медленно, что говорят о псевдо-необратимом ингибировании АХЭ, и стадию карбамилирования называют ингибированием, а стадию декарбамилирования – реактивацией. Константа ингибирования ривастигмином рАХЭ на три порядка меньше, чем константа ингибирования чАХЭ, реактивация за 48 часов при 25 °С составляет 25% для чАХЭ и менее 10% для рАХЭ [22].

Изучение различий в кинетике ингибирования АХЭ из различных источников позволяет пролить свет на особенности влияния отдалённых от активного сайта остатков на кинетику связывания ингибиторов холинэстеразами.

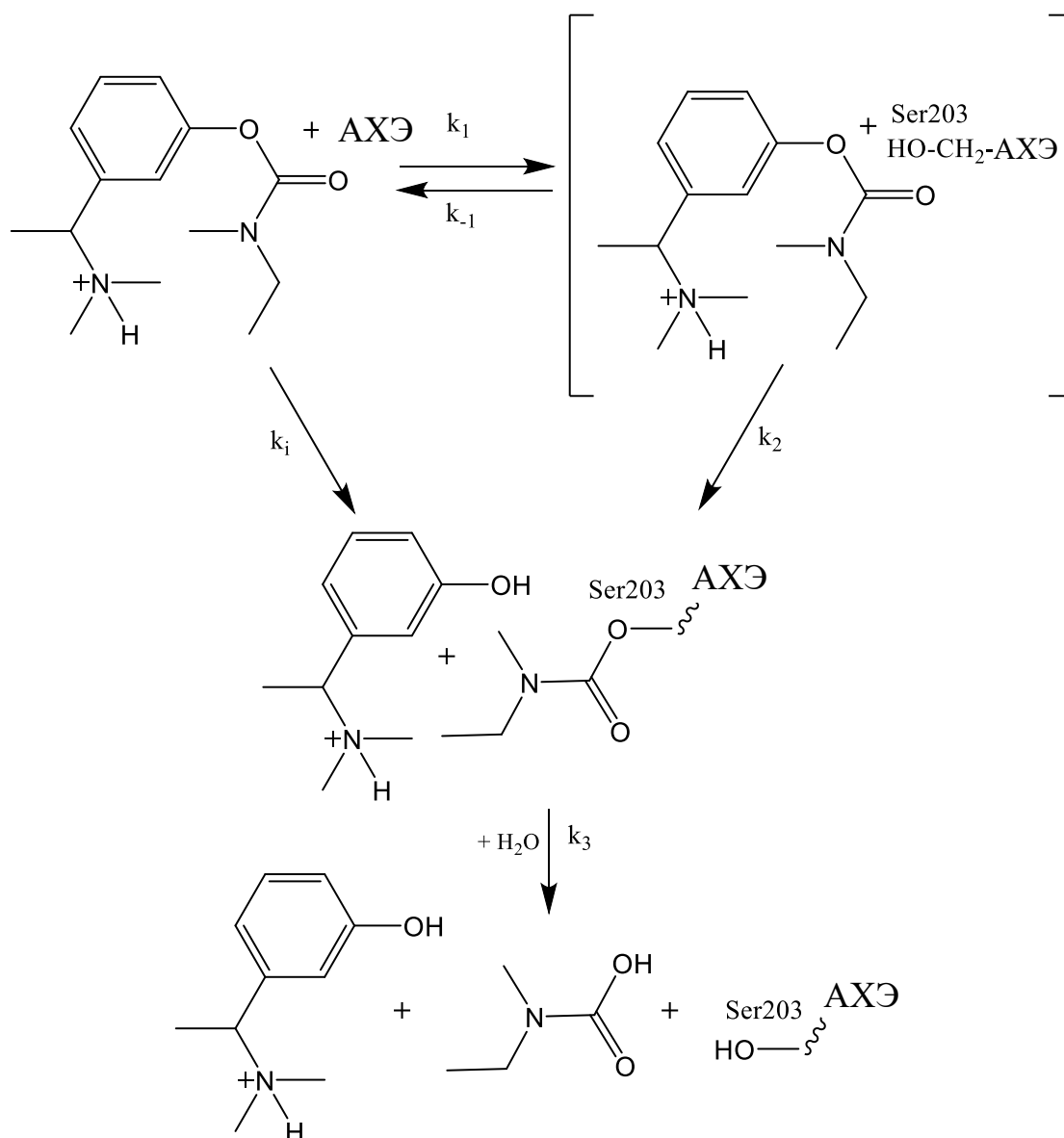


Рисунок 30. Схема ингибирования холинэстераз ривастигмином: не только образование фермент-субстратного комплекса, но и гидролиз.

Согласно [22], ингибирование холинэстеразы ривастигмином происходит по схеме на рисунке 30. Тогда $k_i(pAXЭ)=2\pm0.05(M^{-1}\cdot мин^{-1})$, $k_i(чAXЭ)=3300\pm700(M^{-1}\cdot мин^{-1})$. Бимолекулярная константа скорости k_i является отношением константы скорости ковалентной стадии реакции и константы диссоциации [112].

$$k_i = \frac{k_2}{K_s} \quad (21)$$

Поскольку строение активных сайтов у холинэстераз всех видов практически одинаково, а основные различия затрагивают аминокислоты, выстилающие канал, можно ожидать, что основной вклад в различия констант ингибирования $pAXЭ$ и

чАХЭ вносит константа диссоциации фермент-ингибиторного комплекса K_s [113]. Тогда различие свободной энергии связывания можно оценить по формуле

$$\Delta(\Delta G^0)_{\text{pAXЭ/чАХЭ}} = RT \ln \frac{K_{s,\text{pAXЭ}}}{K_{s,\text{чАХЭ}}} \quad (22)$$

Что по экспериментальным данным [22] составляет 4.4 ккал/моль.

4.3. Докинг молекулы ривастигмина в активный сайт ацетилхолинэстераз *Torpedo californica* и *Homo sapience*

Среди кристаллографических структур холинэстераз, доступных в базе данных PDB, мы выбрали структуры с самым высоким разрешением и с наименьшим количеством отсутствующих остатков: чАХЭ (PDB ID 4EY4), рАХЭ (PDB ID 1W76). Недостающие остатки были добавлены с помощью Modeller 9.14 [80]. Протонирование гистидина было оценено с помощью программы Reduce [114].

Молекулярный докинг с неподвижными белковыми остатками производился в три типа структур для каждой изучаемой ацетилхолинэстеразы: исходную кристаллографическую; полученную после молекулярно-динамической оптимизации в отсутствие ривастигмина в активном сайте; редокинг в структуру, полученную после КМ/ММ оптимизации комплекса ривастигмина с холинэстеразой. Ривастигмин был представлен в четырёх формах: протонированный S-изомер, депротонированный S-изомер, протонированный R-изомер, депротонированный R-изомер.

Для выполнения молекулярного докинга был использован программный пакет AutoDock 4.2 [85]. Силовое поле, используемое AutoDock, содержит вклады, включающие направленную водородную связь с явными полярными атомами водорода, и электростатический вклад. Заряды атома лиганда играют большую роль в оценке возможностей взаимодействия лиганда с активным сайтом. Проверка того, какой способ задания зарядов оказывается наиболее эффективным в случае субстратов, аналогичных ривастигмину, была важным этапом моделирования. Известно, что ривастигмин вступает в реакцию с активным сайтом АХЭ, следовательно, его положение должно обеспечивать возможность нуклеофильной

атаки и стабилизации субстрата остатками оксианионного сайта и сайта связывания положительного заряда. Заряды по методу Гастайгера, стандартные для проведения расчётов по методу молекулярного докинга, [115] были получены в пакете Vabel [116], а заряды по методу Лёвдина и Малликена [117] при помощи программного пакета GAMESS [118].

Самое главное допущение в программе AutoDock – отсутствие гибкости аминокислотных остатков. Существует ограниченная возможность учитывать подвижность части аминокислотных остатков, однако остальная часть белка остаётся неподвижной. В случае АХЭ добавление нескольких аминокислотных остатков в подвижную часть белка не решает проблему общей неподвижности белка, поскольку предполагается, что продвижение субстрата по каналу сопровождается масштабными конформационными изменениями отдалённых от активного сайта аминокислотных остатков. Предполагается, что наличие субстрата в канале АХЭ приводит к конформационным изменениям, способствующим более эффективному связыванию субстрата с активным сайтом, поэтому для докинга субстрата в АХЭ были выбраны три структуры каждой АХЭ: результат рентгено-структурного анализа (РСА в Таблица 19), результат молекулярно-динамического моделирования по протоколу с последовательным увеличением температуры от 0 К до 300 К и уменьшением до 0К (суммарно 16 нс) (ММопт), результат КМ/ММ моделирования (КМопт). При построении исходной структуры для КМ/ММ моделирования использовался результат докинга ривастигмина в оптимизированную молекулярно-динамически структуру с зарядами субстрата, рассчитанными по методу Левдина. В КМ часть вошла молекула ривастигмина, а также аминокислотные остатки активного сайта и оксианионного центра.

В качестве центра решётки выбрана точка между основными аминокислотными остатками активного сайта, взаимодействующими с субстратом: Ser203, His447 и Glu202 (нумерация по чАХЭ). Размер решётки докинга $18\text{\AA} \times 18\text{\AA} \times 18\text{\AA}$ был выбран, исходя из размеров молекулы ривастигмина и с целью предотвратить получение результатов, отвечающих связыванию субстрата с периферическими сайтами фермента. Расчёт проводился генетическим алгоритмом

для 100 попыток поиска, количество оценок энергии в каждой итерации докинга 25 000 000, размер популяции 300. В каждой точке с минимально возможным для данного набора параметров расстоянием нуклеофильной атаки проводился локальный поиск с использованием классического метода Солиса и Ветса [119].

В Таблица 19 приведены энергии связывания, рассчитанные для наилучших по расстоянию нуклеофильной атаки состояний. Если для заданной комбинации параметров структур с расстоянием нуклеофильной атаки менее 4 Å не обнаруживалось, в таблице стоит прочерк.

Таблица 19. Результаты расчёта энергии связывания по методу молекулярного докинга

			чАХЭ			рАХЭ		
			РСА	ММопт	КМопт	РСА	ММопт	КМопт
Малликен	R	0			-6.79	-5.36	-5.72	-6.59
		H ⁺		-5.38	-6.93		-6.22	-6.84
	S	0	-5,04	-5.25	-6.75		-5.79	-6.97
		H ⁺		-5.93	-6.78		-6.53	-6.82
Лёвдин	R	0		-7.92	-9.31	-7.39	-8.10	-9.35
		H ⁺		-7.94	-9.33		-8.55	-9.20
	S	0		-7.91	-9.44		-8.35	-9.56
		H ⁺		-8.52	-9.29		-8.87	-9.45
Гайстагер	R	0			-7.04	-5.61	-5.97	-7.18
		H ⁺			-7.55		-6.89	-7.62
	S	0			-7.17		-6.04	-6.99
		H ⁺		-6.96	-7.59		-7.11	-7.90

Структуры с наилучшим расположением ривастигмина, использованные для дальнейших расчётов, были получены при редокинге протонированного S-ривастигмина с зарядами, полученными по методу Гайстагера, в оптимизированные по методу КМ/ММ белковые структуры.

4.4. Перемещение ривастигмина по каналу ацетилхолинэстеразы *Torpedo californica* и *Homo sapiens*

Для молекулярно-динамического моделирования системы были подготовлены с помощью инструментов программы VMD [82]. Белки были сольватированы молекулами воды TIP3P для создания прямоугольной сольватной оболочки с границами не менее 10 Å от белка. Были добавлены ионы Na^+ и Cl^- для электронейтрализации системы и достижения концентрации 0,15 М, соответствующей физиологическому раствору.

Проводилась предварительная оптимизация структур в программном пакете NAMD по следующему протоколу: Моделирование МД проводилось с помощью NAMD 2.12 [78] с силовым полем CHARMM36 [120] для атомов белка и CGenFF [121, 122] для атомов ривастигмина. Условия проведения молекулярной динамики – давление 1 бар, температура 298 К поддерживалась термостатом и баростатом Ланжевина. Расчёты производились на суперкомпьютере «Ломоносов-2» [123]. Подготовленные структуры были минимизированы на протяжении 200 пс с фиксированными кристаллическими координатами тяжёлых атомов белков, затем сольватные оболочки уравнивались в течение 500 пс с фиксированием всех координат атомов белка. Подготовленные таким образом структуры были использованы для всех последующих расчётов.

Расчёт профиля свободной энергии был проведён методом зонтичной выборки с обменом гамильтонианами. В роли коллективной переменной было выбрано расстояние от карбамильной группы ривастигмина до серина активного сайта фермента. Реакционный путь был разбит на 100 окон по 0,25 Å. Обмен координатами происходил каждые 100 фс. Для каждого белка было рассчитано по 20 нс молекулярной динамики каждой копии системы (суммарно 2 мкс) с $k=0.5$ ккал/моль·Å². Начальные геометрии для каждого окна траектории были получены в предварительных расчётах методом направленной молекулярной динамики.

При расчёте свободной энергии перемещения субстрата по каналу были получены профили свободной энергии, изображённые на Рисунок 31.

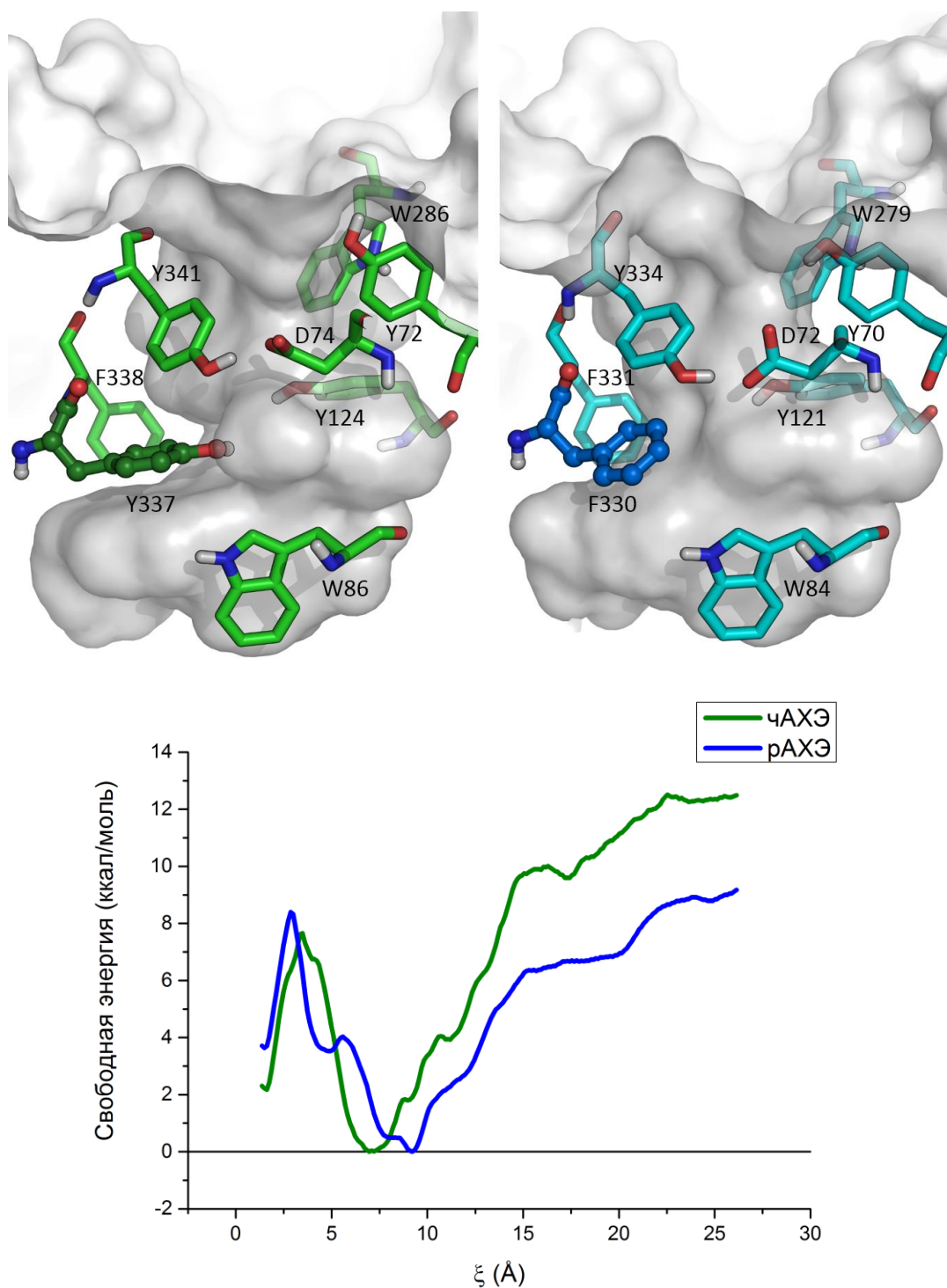


Рисунок 31. Профиль свободной энергии перемещения ривастигмина по каналу. Сравнение трёхмерных структур рАХЭ и чАХЭ в области узких мест канала после выполнения протокола подготовки белка. На двух верхних панелях показаны ориентации остатков узкого места Y124 (Y121) / Y337 (F330) чАХЭ (слева) и рАХЭ (справа). На нижней панели изображён профиль свободной энергии перемещения ривастигмина по каналу чАХЭ и рАХЭ.

Для обеих ацетилхолинэстераз наблюдается образование фермент-субстратного комплекса в положении ривастигмина, при котором карбамильный

атом кислорода образует водородную связь с Tyr124, а положительно заряженная часть субстрата стабилизируется Glu202 (Рисунок 32).

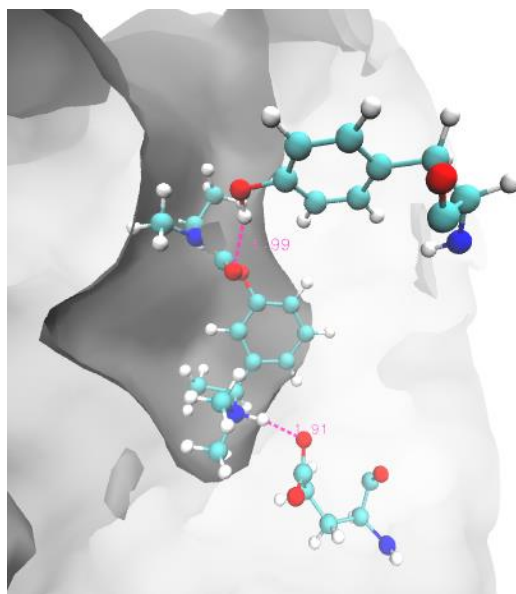


Рисунок 32. Наиболее энергетически выгодное расположение ривастигмина в канале рАХЭ (аналогично таковому у чАХЭ).

При нахождении ривастигмина в этой области канала нуклеофильная атака невозможна, для перехода в область активного сайта необходимо преодолеть энергетический барьер 7,6 ккал/моль для чАХЭ и 8,4 ккал/моль для рАХЭ. Свободная энергия образования непродуктивного фермент-ингибиторного комплекса составляет 8,8 ккал/моль для рАХЭ и 12,3 ккал/моль для чАХЭ, что отражает более высокую скорость ингибирования чАХЭ ривастигмином.

Нами были рассчитаны среднеквадратичные отклонения (RMSD) внутри окон, в которых ривастигмин оказывается в области сужения канала, и для свободного белка. В качестве стартовой структуры для расчёта RMSD была выбрана структура без молекулы ривастигмина в канале.

Как видно из Рисунок 33, при нахождении ривастигмина в области сужения канала, подвижность чАХЭ значительно увеличивается по сравнению со свободным белком, тогда как подвижность рАХЭ практически не меняется. Наиболее подвижными частями обеих АХЭ являются альфа-спирали в области димеризации и наиболее длинная петля 490-500 по нумерации чАХЭ. В случае АХЭ также подвижным участком является вставленная последовательность PPGG в чАХЭ (P258-P259-G260-G261).

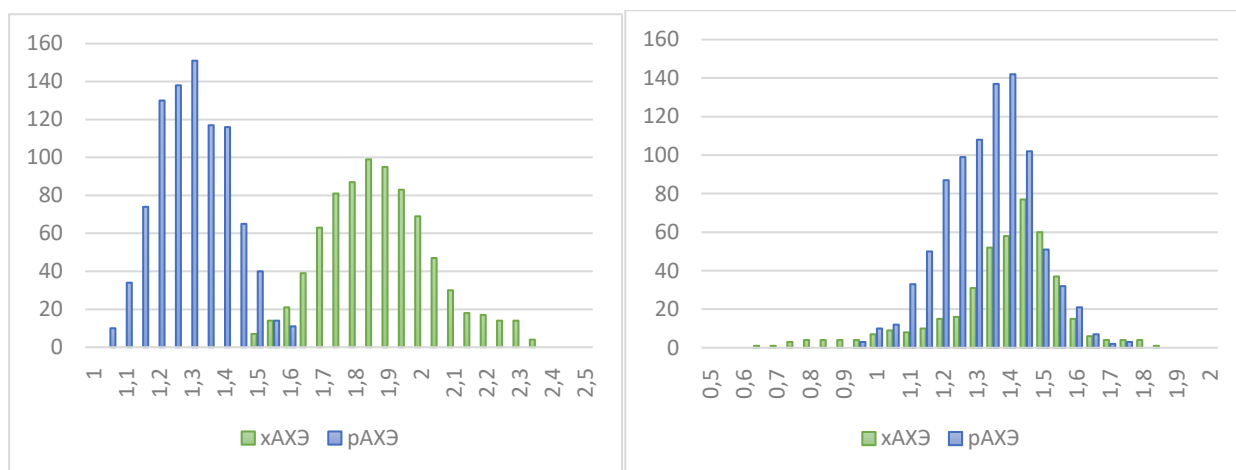


Рисунок 33. RMSD атомов основной цепи внутри окон, в которых ривастигмин оказывается в области сужения канала (слева), и для свободного белка (справа).

Полученные при моделировании поверхности 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.

Однако дальнейшая стабилизация ферментсубстратного комплекса выше для комплекса ривастигмин-рАХЭ. Данные расчёта позволяют объяснить меньшую скорость реактивации рАХЭ по сравнению с чАХЭ.

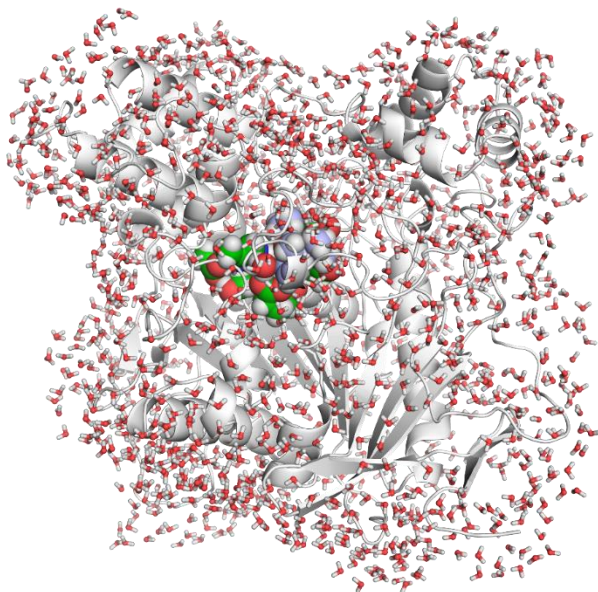
Стоит отметить, что различия в профилях свободной энергии не позволяют объяснить другие различия в кинетике ингибирования чАХЭ и рАХЭ, поскольку расчётные энергетические барьеры перемещения по каналу (около 10 ккал/моль для обоих белков) меньше предполагаемых, полученных из экспериментальных данных, следовательно, скорость лимитирующая стадия – одна из элементарных реакций катализа.

4.5. Моделирование реакции гидролиза ривастигмина методом КМ/ММ

Для оптимизации гибридным методом КМ/ММ был использован программный пакет... NwChem [124]. Для описания ММ части было использовано поле Amber [125], КМ часть описана методом DFT с использованием гибридного функционала PBE0 в базисе cc-pvdz. ММ часть состояла из молекулы белка и

молекул воды, составляющих первую и вторую сферу водородных связей, общее число атомов в системе 12741 (Рисунок 34, А). В КМ часть вошла молекула ривастигмина и аминокислотные остатки G120, G121, G122, S125, E202, S203, A204, S229, E344 и H447 и молекула воды, необходимая для стадии декарбамилирования. Общее количество атомов в квантовой подсистеме составило 122 атома (Рисунок 34, Б).

А



Б

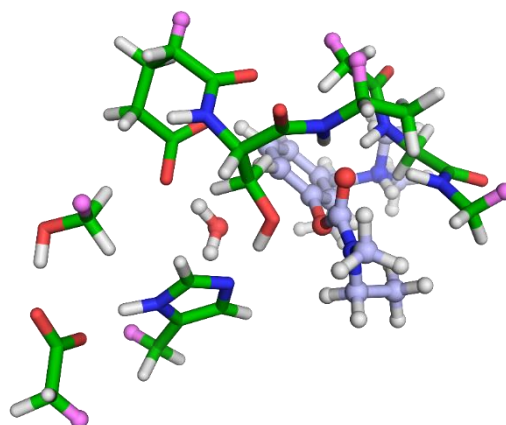


Рисунок 34. Система для КМ/ММ расчета. А – вся система, белок в окружении молекул воды. Б – квантовая подсистема, розовыми шарами показаны атомы-линкеры.

В качестве исходной структуры для оптимизации использована наилучшие структуры из полученных на этапе докинга в кристаллографические и оптимизированные молекулярно-динамически структуры. Структуры, полученные после оптимизации фермент-субстратного комплекса, использовались для редокинга после удаления атомов ривастигмина и молекул воды.

Для расчёта профиля потенциальной энергии первого этапа стадии карбамилирования (образования тетраэдрического интермедиата (ТИ)) координатой реакции было выбрано расстояние между О_γ каталитического серина и атакующим карбамильным атомом углерода, и для распада ТИ с образованием карбамоилфермента – перенос протона с имидазольного катиона на фенольный кислород ривастигмина. Для образования ТИ стадии декарбамилирования

координатой реакции было выбрано расстояние между атомом кислорода молекулы воды и карбамильным атомом углерода, а для его диссоциации – перенос протона с имидазольного катиона на О_γ каталитического серина.

В переходных состояниях рассчитаны частоты колебаний, для каждой стадии получена единственная мнимая частота, соответствующая колебанию.

На Рисунок 35 изображён энергетический профиль стадии карбамилирования чАХЭ и конфигурации стационарных точек: фермент-субстратного комплекса (ФС), тетраэдрического интермедиата (ТИ) и карбамоилфермент (КФ).

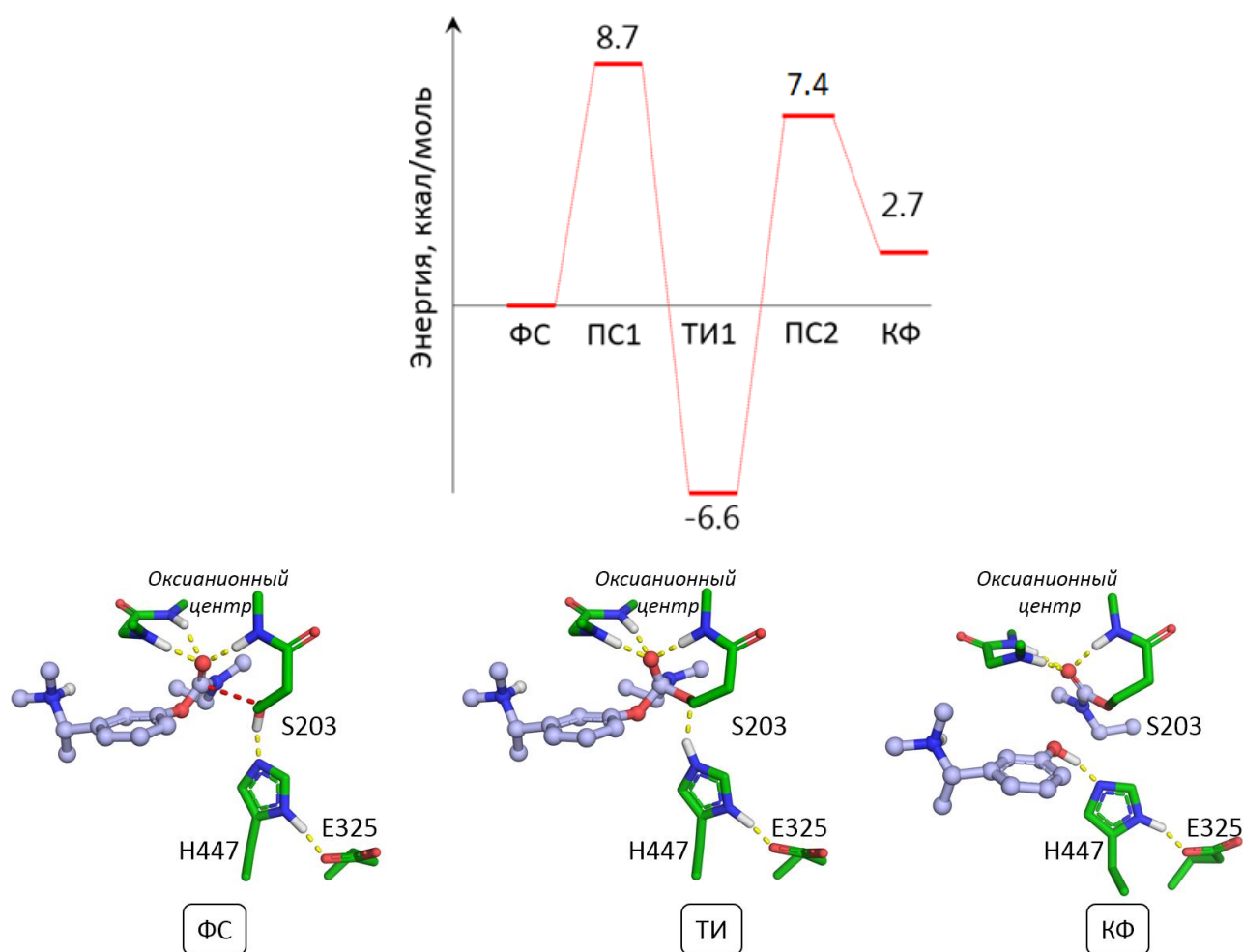
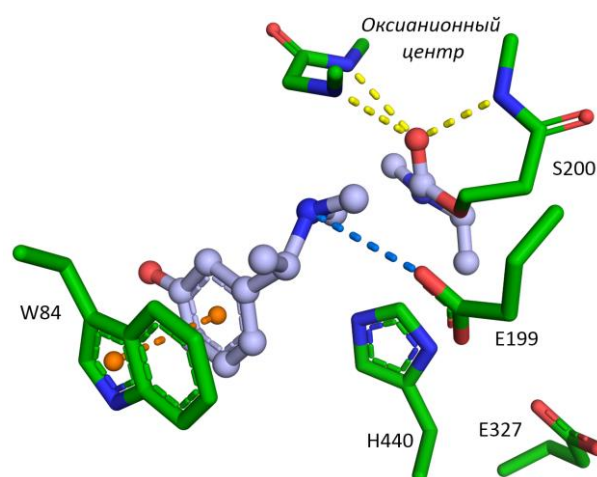


Рисунок 35. Энергетический профиль стадии карбамилирования реакции гидролиза ривастигмина чАХЭ и конфигурации стационарных точек.

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 Оу 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 [22]), показывает, что после разрыва С-О 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) (Рисунок 36, А). При этом происходят небольшие изменения в конформациях близлежащих аминокислотных остатков, в особенности F330, с которым NAP образует Т-стекинг-взаимодействия (Рисунок 36, Б).

А



Б

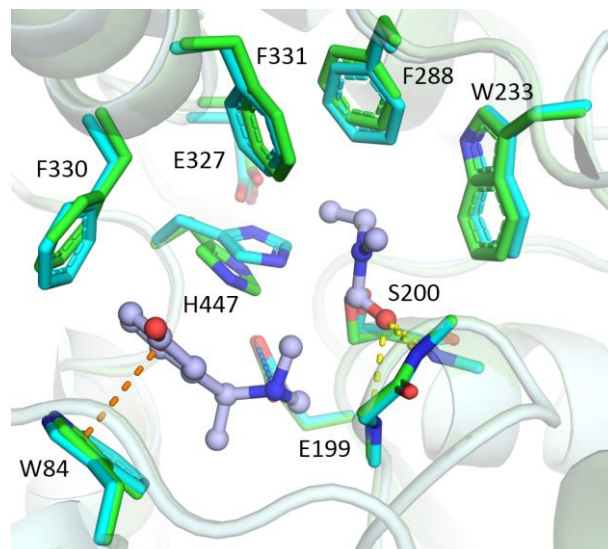


Рисунок 36. Кристаллографическая структура карбамоилфермента рАХЭ (PDB ID 1GQR). А – вид активного сайта. Б – наложение со структурой рАХЭ без лиганда (PDB ID 1EA5).

Таким образом, ингибирование ривастигмина с ацетилхолинэстеразой описывается следующей схемой:

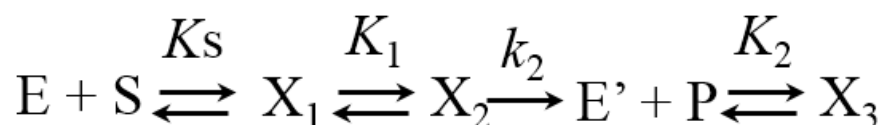


Рисунок 37. Кинетическая схема ингибирования АХЭ ривастигмином.

За образованием непродуктивного фермент-ингибиторного комплекса следует термодинамически невыгодная трансформация (реориентация в реакционно-способное положение), за этим следует реакция ковалентного ингибирования (или по сути стадия карбамилирования медленного субстрата), которая завершается реориентацией продукта в активном сайте. Поскольку реориентация ривастигмина в канале термодинамически не выгодна, эта стадия не влияет на константу диссоциации фермент-ингибиторного комплекса K_s , а приводит к уменьшению наблюдаемой каталитической константы скорости реакции ингибирования [126].

Учитывая, что реориентация ривастигмина в канале для занятия реакционноспособного положения характеризуется достаточно высоким

энергетическим барьером (Рисунок 31), реориентация NAR 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 по расчётам профиля свободной энергии связывания (3,5 ккал/моль) показывает, 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.

Переходя к реакции реактивации (она же стадия декарбамилирования реакции медленного гидролиза), оптимизация структуры КФ чАХЭ с соответствующим положением NAR приводит к стабилизации всей системы на 35 ккал/моль, что соответствует образованию энергетических выгодных взаимодействий NAR, конформационных изменениях близлежащих аминокислотных остатков и перестройке в водной оболочке. Поэтому энергетический профиль следующей стадии, декарбамилирования, принадлежит другой ППЭ и приводится отдельно (Рисунок 38, А). В этом случае уходящая группа фактически выступает как нековалентный ингибитор. При редокинге NAR в структуру КФ были получены оценки энергий связывания очень близкие к полученным для ривастигмина (Таблица 19). То, что уходящая группа была обнаружена в кристаллографической структуре свидетельствует о том, что её выход из активного сайта затруднён. Находясь в этом положении NAR 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.

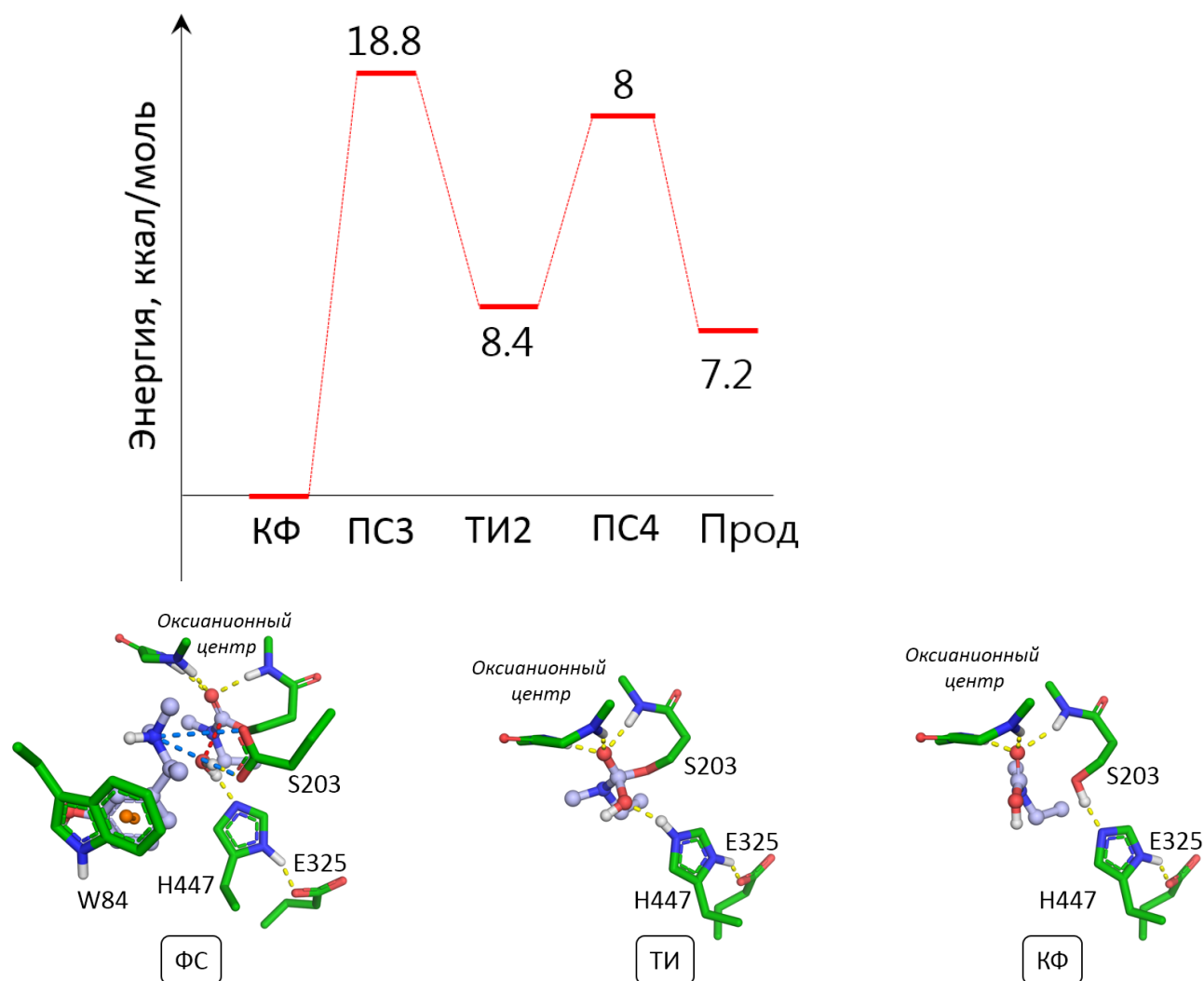


Рисунок 38. Энергетический профиль стадии декарбамилирования реакции гидролиза ривастигмина чАХЭ и конфигурации стационарных точек.

Скоростьлимитирующей стадией этой реакции является образование ТИ. Высокий барьер 18.8 ккал/моль объясняет крайне низкую скорость этой стадии (26% за 48 часов [22]). При этом ТИ менее стабилен, чем КФ, что в целом нехарактерно для холинэстераз [127, 128]. Помимо электронного сопряжения в карбаматной системе, для которой невыгодно образование ТИ с потерей планарности, основной причиной этого является положение заряженной третичной аминогруппы NAR рядом с каталитическим гистидином, который в ходе образования ТИ принимает протон и становится имидазольным катионом (Рисунок

38, 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.

Таким образом, на кинетику взаимодействия ривастигмина с рАХЭ и чАХЭ влияет общая подвижность белковых молекул и аминокислотная замена в канале Y337 (F330), 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.

Глава 5. Влияние точечных мутаций на структурно-динамические свойства каталитического центра фермента на примере БХЭ *Homo sapiens*

5.1. Поиск вариантов БХЭ – каталитических органофосфатгидролаз

Большой интерес представляет превращение БХЭ в каталитическую органофосфатгидролазу с целью получить новую каталитическую, а не стехиометрическую, биоловушку для токсичных органофосфатов.

Первые попытки создать условия для каталитического взаимодействия БХЭ с органофосфатами были предприняты в 1995 году [129]. Авторами были произведены следующие последовательные замены: G115H, G117H, Q119H, и G121H. Мутант G117H показал спонтанную реактивацию с константой реактивации 6.8×10^{-5} и $16 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ для зарина и VX соответственно [113]. Однако поиски мутантов БХЭ с достаточно быстрой реактивацией до сих пор не были успешными.

Расчёты методом КМ/ММ [130] демонстрируют, что остаток E197 активирует нуклеофильную атаку молекулы воды на атом фосфора аддукта органофосфата с холинэстеразой, приводящую к образованию пентакоординированного интермедиата. Основная роль H117 заключается в понижении энергетического барьера и стабилизации пентакоординированного интермедиата. В зависимости от направления переноса протона следующей стадией реакции оказывается старение или реактивация.

Каталитический гистидин (His438 по нумерации БХЭ) играет большую роль как в процессе старения, так и в процессе реактивации, и изменение его ориентации может изменить каталитические свойства бутирилхолинэстеразы в реакциях с ФОС. 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, необходимый для реактивации фермента. Это может быть достигнуто за счёт изменения положения третьего члена каталитической триады – глутаминовой

кислоты. По результатам анализа кристаллографической структуры д.ф.-м.н. Б.Л. Григоренко было высказано предположение, что наиболее благоприятным с точки зрения сохранения функциональной каталитической триады и изменения угла наклона имидазольного кольца для облегчения перехода протона, представляется положение 322, что требует двойной мутации Glu325Gly/Asn322Glu (Рисунок 39). Мутации, затрагивающие каталитические аминокислоты, зачастую являются губительными для фермента, но в данном случае экспериментально было показано, что БХЭ с этой мутацией сохраняет эстеразную активность [131]. Было проведено молекулярно-динамическое исследование влияния этой мутации на динамику белковой молекулы.

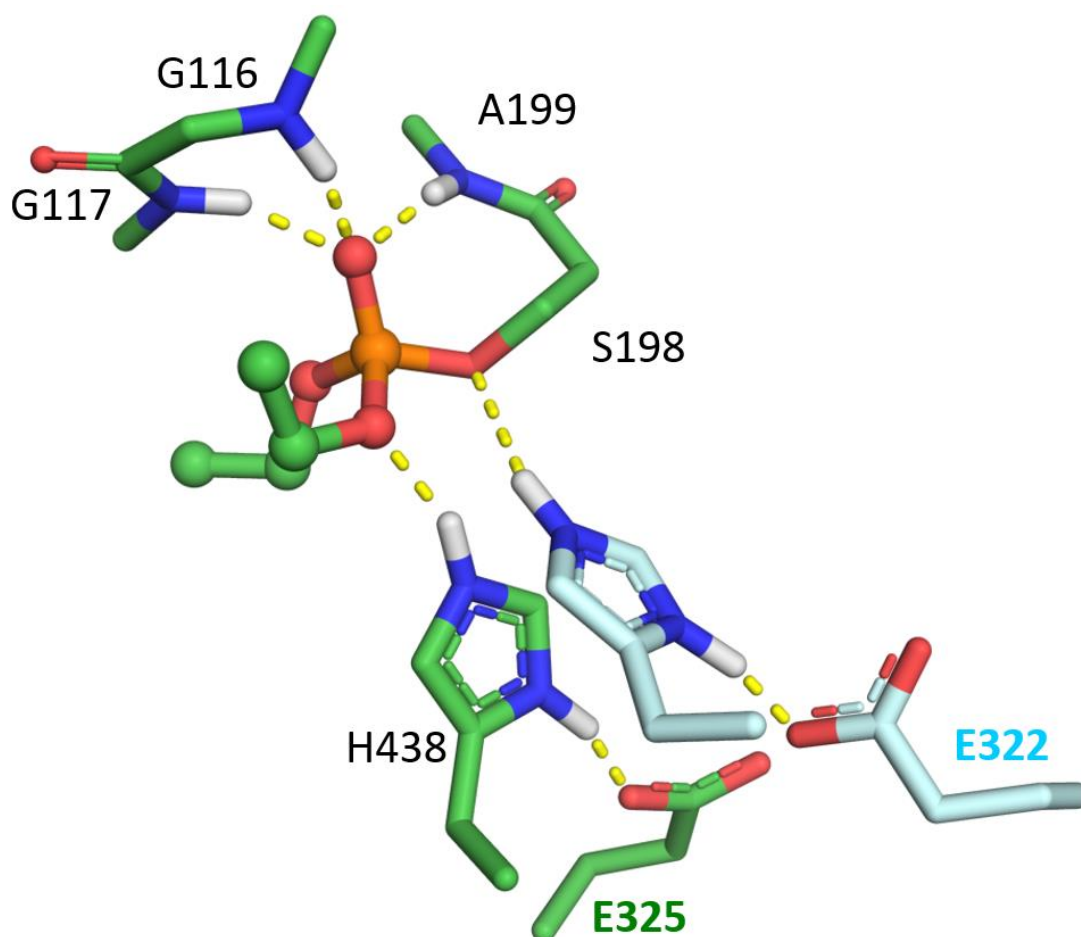


Рисунок 39. Изменение ориентации каталитического гистидина БХЭ (His438) за счёт мутации Asn322Glu/Glu325Gly.

5.2 Молекулярная динамика вариантов бутирилхолинэстеразы

Кристаллографическая структура человеческой бутирилхолинэстеразы PDB ID 1P0I [132] была использована в качестве стартовой структуры для молекулярного моделирования. Конформации недостающих аминокислот D378 и D379 были взяты из другой рентгеновской структуры БХЭ, PDB ID: 2PM8 [17], недостающий остаток Q455 был реконструирован с помощью модуля VMD *psfgen*. Атомы водорода были добавлены для построения сети водородных связей с использованием программного обеспечения Reduce.

Проблема протонирования E197 и E441 остаётся открытой, поэтому в данной работе были использованы системы с различным протонированием остатков. Известно, что протонирование E197 принципиально для ускорения реактивации фермента [133]. Исходя из данных рентгеноструктурного анализа, E197 и E441 связаны водородной связью, таким образом протонированность их состояний не является независимой. Исходя из остального окружения (остатков H438, S224 и протона пептидной связи G439), предпочтительно протонирование E197 [23].

Для модели с двойным мутантом остатки мутировали вручную. Молекулы воды, распознаваемые в кристаллической структуре, были включены в модельную систему и протонированы. С помощью модуля *solvate* VMD добавлены молекулы воды TIP3P до получения коробки с границами, находящимися не ближе 10 Å от белка. Ионы натрия и хлорида добавляли до концентрации ионов 0,15 М с использованием модуля *autoionize* VMD.

Молекулярно-динамическое моделирование проводилось с помощью программы NAMD 2.11 [78] с силовым полем CHARMM36 [79] в суперкомпьютерном центре МГУ им. М.В. Ломоносова [123]. Во время моделирования МД системы поддерживались при постоянной температуре 298K и под давлением 1 атм (ансамбль NPT) с использованием динамики Ланжевена и баростата Нозе-Гувера с применением периодических граничных условий. Для подготовки структуры производили предварительную оптимизацию мутантных остатков и уравнивание с растворителем в течение 2000 шагов минимизации, 1 нс с фиксированными координатами белка (за исключением мутированного

остатка и двух добавленных остатков), и затем структура была полностью минимизирована в течение 2000 шагов (с постепенным увеличением температуры от 0 до 300K и обратным уменьшением).

Начальные 500 нс траектории молекулярной динамики показали, что новая каталитическая триада остается работоспособной в течение длительного моделирования при протонировании E441. Это было подтверждено 3 параллельными расчётами. Показано [134, 135], что для неактивных мутантов каталитическая триада разрушается уже в первые 50 нс МД моделирования. Следовательно, замена каталитической глутаминовой кислоты должна сохранять каталитическую активность фермента.

Из литературных данных известно, что стабильность каталитической триады обеспечивается окружающей сетью водородных связей. Нарушение этой сети может привести к исчезновению активности фермента. Каталитический S198 расположен в α/β -витке, принадлежащем β -листу, который охватывает белок. Цепи β -листа вблизи S198 скрепляются между собой водородными связями между атомами остова Q223 и S224 на одной цепи и G196 и S198 на другой. Петля, несущая каталитический H438, поддерживается вблизи S198 водородными связями между боковой цепью E441 и Q223. Эта петля фиксируется водородными связями между боковой цепью N322 и E441 и кислородом основной цепи M437. Таким образом, N322 играет роль в сети водородных связей, и его замена в двойном мутанте должна быть компенсирована для поддержания стабильности фермента.

5.3. Анализ конформационных изменений по методу Маркова

Для анализа конформационных изменений белков вдоль траекторий МД был использован подход модели состояния Маркова, описанный в этой работе ранее в главе 3.6. Торсионные углы ϕ , ψ и χ остатков 197, 198, 223, 224, 322, 325, 419 и 441 были выбраны в качестве правильных координат. Это остатки, участвующие в сети водородных связей, стабилизирующих каталитическую триаду. Алгоритм вМНК был использован для уменьшения размерности. Метод кластеризации k-средних был использован для построения 100 микросостояний, время задержки было выбрано равным 5 нс с учётом результатов расчёта подразумеваемых временных

шкал. Микросостояния были сгруппированы в 6 метастабильных макросостояний с помощью РССА+ (кластерного анализа по методу Перрона). Пути перехода были рассчитаны с помощью теории дискретных путей перехода в ее формулировке МСМ. Для проверки результатов был выполнен тест Чепмена-Колмогорова.

На Рисунок 40 показаны 5 наиболее заселённых состояний и наиболее распространенные пути перехода для системы с протонированным E197. В этом случае из-за смещения H438 каталитическая триада оказывается неактивной в двух макросостояниях. В других макросостояниях каталитическая триада находится в активной конформации. Гидроксильная группа S198 образует водородную связь с атомом кислорода главной цепи S224. Как было отмечено и при МД моделировании фермента дикого типа [136], S198 остается достаточно близко к H438, чтобы был возможен перенос протона, сопровождающий образование тетраэдрического интермедиата, что обеспечивает возможность каталитической реакции. Общая стабильность фермента поддерживается водородной связью между E322 и S224 (наблюдается во всех макросостояниях); Q223 с E441 или W471 (в макросостояниях с активной триадой). Таким образом, влияние мутации N322 на сеть водородных связей компенсируется этими взаимодействиями, и они поддерживают стабильность белка. Кроме того, была обнаружена новая водородная связь между E441 и Y419. Протонированный E197 в некоторых макросостояниях взаимодействует с E441. Таким образом, возможность переноса протона между E197 и E441, наблюдаемая у дикого типа, сохраняется.

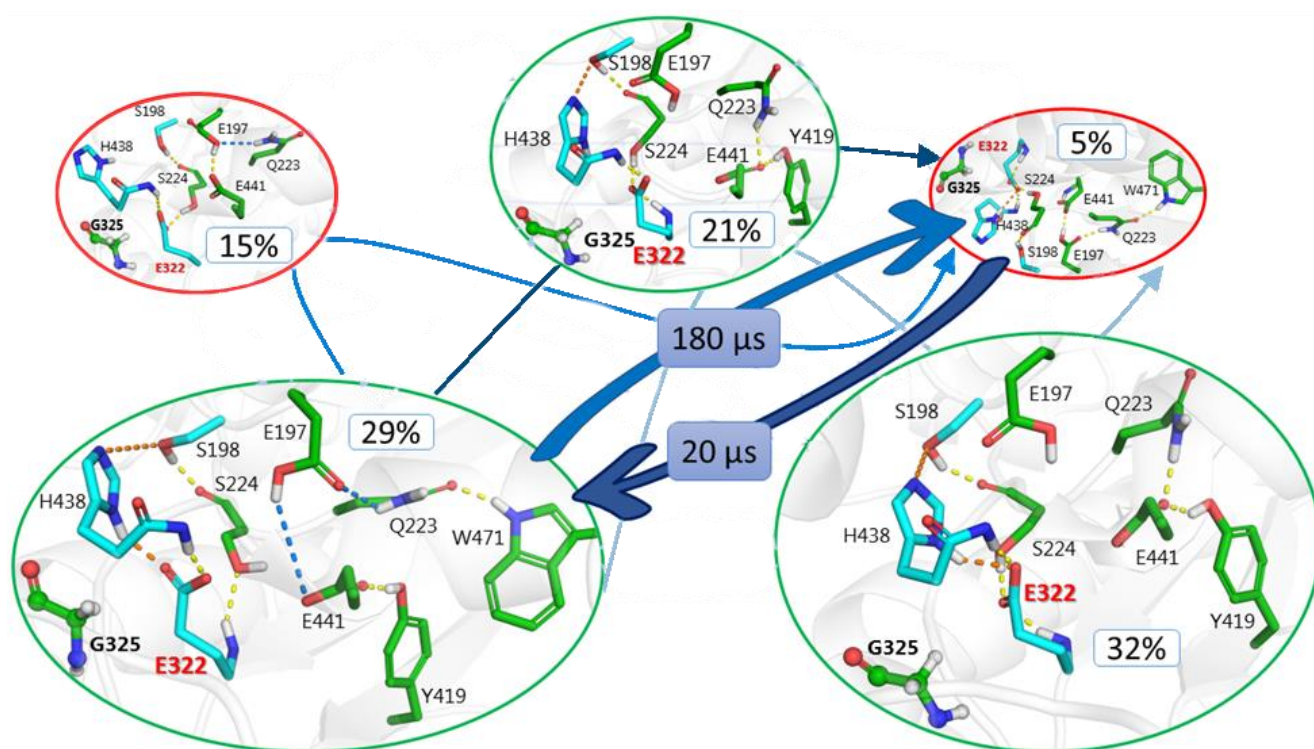


Рисунок 40. Пути перехода между макросостояниями остатков, участвующих в сети водородных связей, стабилизируют новую каталитическую триаду. Показаны только основные макросостояния. Атомы углерода каталитических остатков окрашены в синий цвет. Основные атомы цепей взаимодействующих остатков показаны, когда они участвуют в водородных связях. Жёлтые пунктирные линии показывают водородные связи, оранжевые пунктирные линии показывают возможные водородные связи в каталитической триаде (расстояние между атомами H438 Nε2 и S198 Oγ в пределах 4Å), синие пунктирные линии показывают возможную H-связь через водяные мостики. Макросостояния с оперативной каталитической триадой находятся в зелёных кружках; макросостояния с нарушенной каталитической триадой находятся в красных кружках; относительные популяции макросостояний (%) указаны в полях, и размер кружков пропорционален этим процентам. Время прохождения для всех путей показано в полях на стрелках. Система с протонированным E197.

В случае протонированного E441, смещение H438, которое вызывает разрушение каталитической триады, не наблюдалось в 4 из наиболее занятых макросостояний (Рисунок 41). Во всех конформациях каталитическая триада стабильна, S198 образует водородную связь с E197, но достаточно близок к H438 (расстояние между атомами H438 Nε2 и S198 Oγ в пределах 4Å), чтобы переориентироваться и участвовать в каталитическом акте. Во всех макросостояниях H438 имеет водородную связь с E322, который всегда имеет водородную связь с S224. Вместо взаимодействия с N322 петля, содержащая H438,

у мутанта стабилизируется посредством взаимодействий между Y419 и Q223 и между E441 и H423. В одном переходном макросостоянии E441 также образует водородные связи с Y419 и Q223.

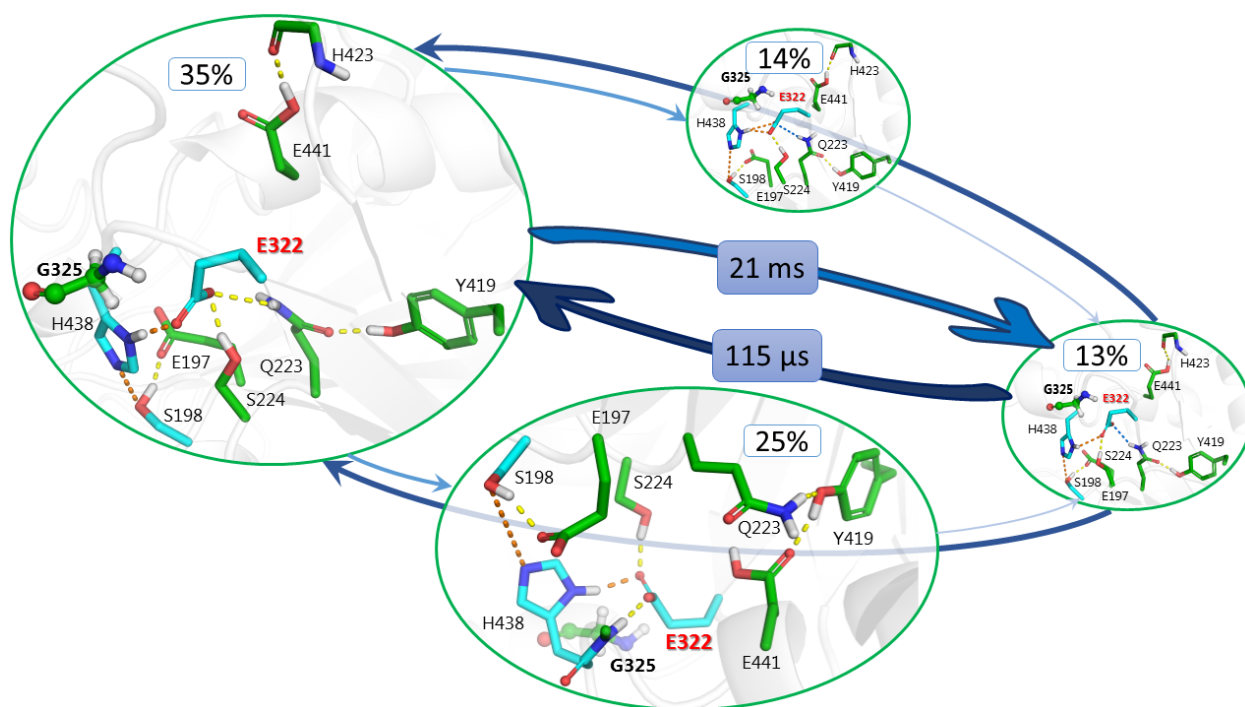


Рисунок 41. Пути перехода между макросостояниями остатков, участвующих в сети водородных связей, стабилизируют новую каталитическую триаду. Система с протонированным E441.

Сравнение константных конформаций двойного мутанта, где E197 или E441 протонированы с конформациями фермента, в которых оба остатка не являются протонированными (Рисунок 42), показывает, что эти последние аналогичны системе с E197, протонированным. В случае депротонирования сохраняются основные типы взаимодействий: S224 взаимодействует с E322, Q223 с E441; в одном макросостоянии H438 оказывается вне каталитической триады, в то время как в других макросостояниях он остаётся действующим.

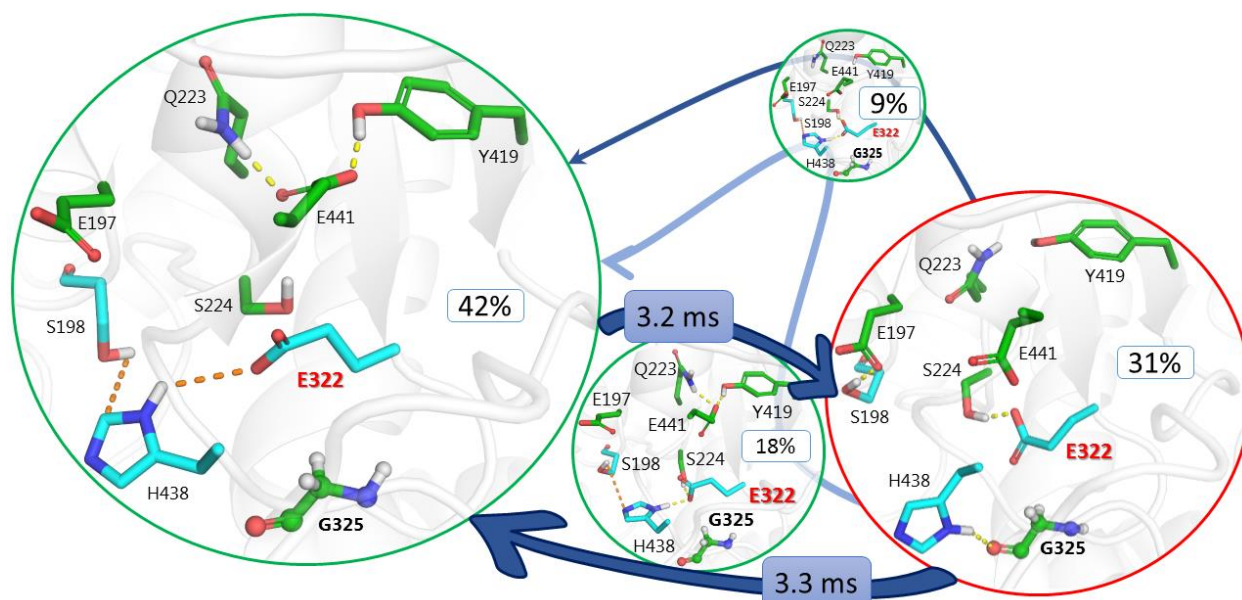
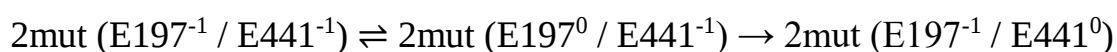


Рисунок 42. Пути перехода между макросостояниями остатков, участвующих в сети водородных связей, стабилизируют новую каталитическую триаду. Система с депротонированными E441 и E197.

Конформации системы с протонированным E441 весьма отличны от конформаций белка в макросостояниях белка, депротонированного по обоим остаткам глутаминовой кислоты (Рисунок 412), то есть протонирование E441 вызывает конформационные изменения. E197 и E441 взаимодействуют, когда E197 протонирован, следовательно, после протонирования E197 протон может быть необратимо перенесен в E441, так что равновесие между различными формами протонирования фермента:



смещено к форме с протонированным E441, что благоприятствует формированию активной каталитической триады.

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 спиральями 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 сокращений

NAP – (-)-S-3-[1-(диметиламино)этил]фенол

PCCA+ – кластерный анализа по методу Перрона

PDB ID – порядковый номер в базе данных белковых структур

RMSD – стандартное квадратичное отклонение позиций атомов

SASA – площадь, доступная для контакта с растворителем

АХЭ – ацетилхолинэстераза

БСФ – бензилсульфонилфторид

БХЭ – бутирилхолинэстераза

вМНК – временной метод независимых компонент

дАХЭ – ацетилхолинэстераза *Drosophila melanogaster*

КМ/ММ – комбинированный метод квантовой механики и молекулярной механики

КМопт – оптимизированный с применением комбинированного метода квантовой механики и молекулярной механики

КФ - карбамоилфермент

мАХЭ - ацетилхолинэстераза *Mus musculus*

МД – молекулярная динамика

МЗВ - метод зонтичной выборки

ММопт – оптимизированный с применением только молекулярной динамики

МСМ – модель состояний Маркова

НЛГ – нейролигин

рАХЭ – ацетилхолинэстераза *Torpedo californica*

ТИ – тетраэдрический интермедиат

ФМСФ - фенилметилсульфонилфторид

ФОС – фосфорорганическое соединение

ФС-фермент-субстратный комплекс

ХЭ – холинэстераза

чАХЭ – холинэстераза *Homo sapience*

Список литературы

1. Hilger D., Masureel M., Kobilka B. K. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes // *Nat Struct Mol Biol.* – 2018. – Т. 25, № 1. – С. 4-12.
2. Sledz P., Caflisch A. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics // *Curr Opin Struct Biol.* – 2018. – Т. 48. – С. 93-102.
3. Seetharaman S., Etienne-Manneville S. Integrin diversity brings specificity in mechanotransduction // *Biol Cell.* – 2018. – Т. 110, № 3. – С. 49-64.
4. Qu Q., Takahashi Y. H., Yang Y., Hu H., Zhang Y., Brunzelle J. S., Couture J. F., Shilatifard A., Skiniotis G. Structure and Conformational Dynamics of a COMPASS Histone H3K4 Methyltransferase Complex // *Cell.* – 2018. – Т. 174, № 5. – С. 1117-1126 e12.
5. Hansen K. B., Yi F., Perszyk R. E., Furukawa H., Wollmuth L. P., Gibb A. J., Traynelis S. F. Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors // *J Gen Physiol.* – 2018. – Т. 150, № 8. – С. 1081-1105.
6. Gutzeit V. A., Thibado J., Stor D. S., Zhou Z., Blanchard S. C., Andersen O. S., Levitz J. Conformational dynamics between transmembrane domains and allosteric modulation of a metabotropic glutamate receptor // *Elife.* – 2019. – Т. 8.
7. Olsen J. G., Teilum K., Kragelund B. B. Behaviour of intrinsically disordered proteins in protein–protein complexes with an emphasis on fuzziness // *Cellular and Molecular Life Sciences.* – 2017. – Т. 74, № 17. – С. 3175-3183.
8. Campbell E., Kaltenbach M., Correy G. J., Carr P. D., Porebski B. T., Livingstone E. K., Afriat-Jurnou L., Buckle A. M., Weik M., Hollfelder F., Tokuriki N., Jackson C. J. The role of protein dynamics in the evolution of new enzyme function // *Nature Chemical Biology.* – 2016. – Т. 12. – С. 944.
9. Ma B., Nussinov R. Conformational footprints // *Nature Chemical Biology.* – 2016. – Т. 12. – С. 890.
10. Miao Y., Feher V. A., McCammon J. A. Gaussian Accelerated Molecular Dynamics: Unconstrained Enhanced Sampling and Free Energy Calculation // *Journal of Chemical Theory and Computation.* – 2015. – Т. 11, № 8. – С. 3584-3595.

11. Maximova T., Moffatt R., Ma B., Nussinov R., Shehu A. Principles and Overview of Sampling Methods for Modeling Macromolecular Structure and Dynamics // *PLOS Computational Biology*. – 2016. – T. 12, № 4. – C. e1004619.
12. Plattner N., Doerr S., De Fabritiis G., Noé F. Complete protein–protein association kinetics in atomic detail revealed by molecular dynamics simulations and Markov modelling // *Nature Chemistry*. – 2017. – T. 9, № 10. – C. 1005-1011.
13. Tripathi A., Srivastava U. C. Acetylcholinesterase :A Versatile Enzyme of Nervous System // *Annals of Neurosciences*. – 2008. – T. 15, № 4. – C. 106-111.
14. Lockridge O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses // *Pharmacol Ther.* – 2015. – T. 148. – C. 34-46.
15. Kronman C., Velan B., Marcus D., Ordentlich A., Reuveny S., Shafferman A. Involvement of oligomerization, N-glycosylation and sialylation in the clearance of cholinesterases from the circulation // *Biochem J.* – 1995. – T. 311 (Pt 3). – C. 959-67.
16. Chen V. P., Luk W. K. W., Chan W. K. B., Leung K. W., Guo A. J. Y., Chan G. K. L., Xu S. L., Choi R. C. Y., Tsim K. W. K. Molecular Assembly and Biosynthesis of Acetylcholinesterase in Brain and Muscle: the Roles of t-peptide, FHB Domain, and N-linked Glycosylation // *Frontiers in molecular neuroscience*. – 2011. – T. 4. – C. 36-36.
17. Masson P., Nachon F. Cholinesterase reactivators and bioscavengers for pre- and post-exposure treatments of organophosphorus poisoning // *J Neurochem.* – 2017.10.1111/jnc.14026.
18. Sussman J. L., Harel M., Silman I. Three-dimensional structure of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase drugs // *Chemico-Biological Interactions*. – 1993. – T. 87, № 1-3. – C. 187-97.
19. Harel M., Kryger G., Rosenberry T. L., Mallender W. D., Lewis T., Fletcher R. J., Guss J. M., Silman I., Sussman J. L. Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors // *Protein Science*. – 2000. – T. 9, № 6. – C. 1063-72.
20. Brazzolotto X., Wandhammer M., Ronco C., Trovaslet M., Jean L., Lockridge O., Renard P.-Y., Nachon F. Human butyrylcholinesterase produced in insect cells: huprine-

based affinity purification and crystal structure // FEBS Journal. – 2012. – T. 279, № 16. – C. 2905-2916.

21. Kryger G., Harel M., Giles K., Toker L., Velan B., Lazar A., Kronman C., Barak D., Ariel N., Shafferman A., Silman I., Sussman J. L. Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II // Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography. – 2000. – T. 56, № 11. – C. 1385-1394.

22. Bar-On P., Millard C. B., Harel M., Dvir H., Enz A., Sussman J. L., Silman I. Kinetic and structural studies on the interaction of cholinesterases with the anti-Alzheimer drug rivastigmine // Biochemistry. – 2002. – T. 41, № 11. – C. 3555-64.

23. Lushchekina S., Masson P. Catalytic bioscavengers against organophosphorus agents: mechanistic issues of self-reactivating cholinesterases // Toxicology. – 2018. – T. 409. – C. 91-102.

24. Lushchekina S. V., Schopfer L. M., Grigorenko B. L., Nemukhin A. V., Varfolomeev S. D., Lockridge O., Masson P. Optimization of Cholinesterase-Based Catalytic Bioscavengers Against Organophosphorus Agents // Front Pharmacol. – 2018. – T. 9. – C. 211.

25. Massoulie J., Bon S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates // Annu Rev Neurosci. – 1982. – T. 5. – C. 57-106.

26. GR Sridhar P. L., Allam Appa Rao. Phylogenetic Tree Construction of Butyrylcholinesterase Sequences in Life Forms // J Assoc Physicians India. – 2006. – T. 54. – C. 122.

27. Pezzementi L., Nachon F., Chatonnet A. Evolution of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in the Vertebrates: An Atypical Butyrylcholinesterase from the Medaka *Oryzias latipes* // PLoS ONE. – 2011. – T. 6, № 2. – C. e17396.

28. Silman I., Sussman J. L. Acetylcholinesterase: ‘classical’ and ‘non-classical’ functions and pharmacology // Current Opinion in Pharmacology. – 2005. – T. 5, № 3. – C. 293-302.

29. Karczmar A. G. Cholinesterases (ChEs) and the cholinergic system in ontogenesis and phylogenesis, and non-classical roles of cholinesterases - a review // *Chem Biol Interact.* – 2010. – T. 187, № 1-3. – C. 34-43.
30. Lockridge O. Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine // *Pharmacology & Therapeutics.* – 1990. – T. 47, № 1. – C. 35-60.
31. Gorelick D. A. Enhancing cocaine metabolism with butyrylcholinesterase as a treatment strategy. // *Drug and Alcohol Dependence.* – 1997. – T. 48, № 3. – C. 159-65.
32. Brimijoin S., Chen V. P., Pang Y. P., Geng L., Gao Y. Physiological roles for butyrylcholinesterase: A BChE-ghrelin axis // *Chem Biol Interact.* – 2016. – T. 259, № Pt B. – C. 271-275.
33. Rahimi Z., Ahmadi R., Vaisi-Raygani A., Rahimi Z., Bahrehmand F., Parsian A. Butyrylcholinesterase (BChE) activity is associated with the risk of preeclampsia: influence on lipid and lipoprotein metabolism and oxidative stress // *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine.* – 2013. – T. 26, № 16. – C. 1590-1594.
34. Wessler I., Kilbinger H., Bittinger F., Kirkpatrick C. J. The Biological Role of Non-neuronal Acetylcholine in Plants and Humans // *The Japanese Journal of Pharmacology.* – 2001. – T. 85, № 1. – C. 2-10.
35. Roshchina V. V. Evolutionary Considerations of Neurotransmitters in Microbial, Plant, and Animal Cells. *Microbial Endocrinology* //. – 2010.
36. Birks J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2006.10.1002/14651858.CD005593 № 1. – C. CD005593.
37. A review of butyrylcholinesterase as a therapeutic target in the treatment of Alzheimer's disease. / Nordberg A., Ballard C., Bullock R., Darreh-Shori T., Somogyi M., 2013. – T. 2.
38. Leon R., Garcia A. G., Marco-Contelles J. Recent advances in the multitarget-directed ligands approach for the treatment of Alzheimer's disease // *Med Res Rev.* – 2013. – T. 33, № 1. – C. 139-89.
39. Zhou G., Marathe G. K., Hartiala J., Hazen S. L., Allayee H., Tang W. H. W., McIntyre T. M. Aspirin Hydrolysis in Plasma Is a Variable Function of

Butyrylcholinesterase and Platelet-activating Factor Acetylhydrolase 1b2 (PAFAH1b2) // Journal of Biological Chemistry. – 2013. – T. 288, № 17. – C. 11940-11948.

40. Muller T. C., Rocha J. B., Morsch V. M., Neis R. T., Schetinger M. R. Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity // Biochim Biophys Acta. – 2002. – T. 1587, № 1. – C. 92-8.

41. Carmona G. N., Jufer R. A., Goldberg S. R., Gorelick D. A., Greig N. H., Yu Q. S., Cone E. J., Schindler C. W. Butyrylcholinesterase accelerates cocaine metabolism: in vitro and in vivo effects in nonhuman primates and humans // Drug Metab Dispos. – 2000. – T. 28, № 3. – C. 367-71.

42. Zheng F., Xue L., Hou S. R., Liu J. J., Zhan M., Yang W. C., Zhan C. G. A highly efficient cocaine-detoxifying enzyme obtained by computational design // Nature Communications. – 2014. – T. 5.

43. Masson P., Lockridge O. Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: Catalytic complexities and hysteretic behavior // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2010. – T. 494, № 2. – C. 107-120.

44. Nepovimova E., Kuca K. Chemical warfare agent NOVICHOK - mini-review of available data // Food Chem Toxicol. – 2018. – T. 121. – C. 343-350.

45. Ashani Y., Pistinner S. Estimation of the upper limit of human butyrylcholinesterase dose required for protection against organophosphates toxicity: A mathematically based toxicokinetic model // Toxicological Sciences. – 2004. – T. 77, № 2. – C. 358-367.

46. Ollis D. L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S. M., Harel M., Remington S. J., Silman I., Schrag J., et al. The alpha/beta hydrolase fold // Protein Eng. – 1992. – T. 5, № 3. – C. 197-211.

47. Comparative enzymology of cholinesterases. IUL Biotechnology Series. / Moralev S. N., Rozengart E. V. – La Jolla: Internat'l University Line, 2007. – T. 6: IUL Biotechnology Series. – 484 c.

48. Massoulie J. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases // Neurosignals. – 2002. – T. 11, № 3. – C. 130-43.

49. Sussman J., Harel M., Frolov F., Oefner C., Goldman A., Tokar L., Silman I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein // *Science*. – 1991. – T. 253, № 5022. – C. 872-879.
50. Bourne Y., Grassi J., Bougis P. E., Marchot P. Conformational Flexibility of the Acetylcholinesterase Tetramer Suggested by X-ray Crystallography // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – T. 274, № 43. – C. 30370-30376.
51. Harel M., Kleywegt G. J., Ravelli R. B., Silman I., Sussman J. L. Crystal structure of an acetylcholinesterase-fasciculin complex: interaction of a three-fingered toxin from snake venom with its target // *Structure*. – 1995. – T. 3, № 12. – C. 1355-66.
52. Cheung J., Rudolph M. J., Burshteyn F., Cassidy M. S., Gary E. N., Love J., Franklin M. C., Height J. J. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands // *J Med Chem*. – 2012. – T. 55, № 22. – C. 10282-6.
53. Han Q., Wong D. M., Robinson H., Ding H., Lam P. C. H., Totrov M. M., Carlier P. R., Li J. Crystal structure of acetylcholinesterase catalytic subunits of the malaria vector *Anopheles gambiae* // *Insect Sci*. – 2018. – T. 25, № 4. – C. 721-724.
54. Porschke D., Creminon C., Cousin X., Bon C., Sussman J., Silman I. Electrooptical measurements demonstrate a large permanent dipole moment associated with acetylcholinesterase // *Biophys J*. – 1996. – T. 70, № 4. – C. 1603-8.
55. Felder C. E., Botti S. A., Lifson S., Silman I., Sussman J. L. External and internal electrostatic potentials of cholinesterase models // *J Mol Graph Model*. – 1997. – T. 15, № 5. – C. 318-27, 335-7.
56. Field M. J., Wymore T. Multiscale modeling of nerve agent hydrolysis mechanisms: a tale of two Nobel Prizes // *Physica Scripta*. – 2014. – T. 89, № 10. – C. 108004.
57. Lundy P. M., Raveh L., Amitai G. Development of the Bisquaternary Oxime HI-6 Toward Clinical Use in the Treatment of Organophosphate Nerve Agent Poisoning // *Toxicological Reviews*. – 2006. – T. 25, № 4. – C. 231-243.

58. Worek F., Eyer P., Aurbek N., Szinicz L., Thiermann H. Recent advances in evaluation of oxime efficacy in nerve agent poisoning by in vitro analysis // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2007. – T. 219, № 2-3. – C. 226-34.

59. Worek F., Thiermann H. The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorus compounds // *Pharmacol Ther.* – 2013. – T. 139, № 2. – C. 249-59.

60. Kovach I. M. Stereochemistry and secondary reactions in the irreversible inhibition of serine hydrolases by organophosphorus compounds // *Journal of Physical Organic Chemistry.* – 2004. – T. 17, № 67. – C. 602-614.

61. Masson P., Nachon F., Lockridge O. Structural approach to the aging of phosphorylated cholinesterases // *Chem Biol Interact.* – 2010. – T. 187, № 1-3. – C. 157-62.

62. Zhuang Q., Franjesevic A. J., Corrigan T. S., Coldren W. H., Dicken R., Sillart S., DeYong A., Yoshino N., Smith J., Fabry S., Fitzpatrick K., Blanton T. G., Joseph J., Yoder R. J., McElroy C. A., Ekici O. D., Callam C. S., Hadad C. M. Demonstration of In Vitro Resurrection of Aged Acetylcholinesterase after Exposure to Organophosphorus Chemical Nerve Agents // *J Med Chem.* – 2018. – T. 61, № 16. – C. 7034-7042.

63. Quinn D. M., Topczewski J., Yasapala N., Lodge A. Why is Aged Acetylcholinesterase So Difficult to Reactivate? // *Molecules.* – 2017. – T. 22, № 9.

64. Kohn W. D., Mant C. T., Hodges R. S. Alpha-helical protein assembly motifs // *J Biol Chem.* – 1997. – T. 272, № 5. – C. 2583-6.

65. S. Kamtekar M. H. H. The four-helix bundle: what determines a fold? // *The FASEB Journal.* – 1995. – T. 9. – C. 1013-1022.

66. Presnell S. R., Cohen F. E. Topological distribution of four-alpha-helix bundles // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 1989. – T. 86, № 17. – C. 6592-6596.

67. Robinson C. R., Sligar S. G. Electrostatic stabilization in four-helix bundle proteins // *Protein Sci.* – 1993. – T. 2, № 5. – C. 826-37.

68. Amprazi M., Kotsifaki D., Providaki M., Kapetanidou E. G., Fellas G., Kyriazidis I., Pérez J., Kokkinidis M. Structural plasticity of 4- α -helical bundles exemplified by the

puzzle-like molecular assembly of the Rop protein // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – T. 111, № 30. – C. 11049-11054.

69. Hill R. B., Raleigh D. P., Lombardi A., DeGrado W. F. De Novo Design of Helical Bundles as Models for Understanding Protein Folding and Function // *Accounts of Chemical Research*. – 2000. – T. 33, № 11. – C. 745-754.

70. Bourne Y., Marchot P. The neuroligins and their ligands: from structure to function at the synapse // *J Mol Neurosci*. – 2014. – T. 53, № 3. – C. 387-96.

71. Fabrichny I. P., Leone P., Sulzenbacher G., Comoletti D., Miller M. T., Taylor P., Bourne Y., Marchot P. Structural analysis of the synaptic protein neuroligin and its beta-neurexin complex: determinants for folding and cell adhesion // *Neuron*. – 2007. – T. 56, № 6. – C. 979-91.

72. Bottos A., Destro E., Rissone A., Graziano S., Cordara G., Assenzio B., Cera M. R., Mascia L., Bussolino F., Arese M. The synaptic proteins neurexins and neuroligins are widely expressed in the vascular system and contribute to its functions // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2009. – T. 106, № 49. – C. 20782-7.

73. Sudhof T. C. Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease // *Nature*. – 2008. – T. 455, № 7215. – C. 903-11.

74. Lenfant N., Hotelier T., Bourne Y., Marchot P., Chatonnet A. Tracking the origin and divergence of cholinesterases and neuroligins: the evolution of synaptic proteins // *J Mol Neurosci*. – 2014. – T. 53, № 3. – C. 362-9.

75. Gilbert M. M., Auld V. J. Evolution of clams (cholinesterase-like adhesion molecules): structure and function during development // *Front Biosci*. – 2005. – T. 10. – C. 2177-92.

76. Consortium T. U. Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013 // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – T. 41, № D1. – C. D43-D47.

77. Comoletti D., Grishaev A., Whitten A. E., Tsigelny I., Taylor P., Trewhella J. Synaptic arrangement of the neuroligin/beta-neurexin complex revealed by X-ray and neutron scattering // *Structure*. – 2007. – T. 15, № 6. – C. 693-705.

78. Phillips J. C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R. D., Kalé L., Schulten K. Scalable molecular dynamics with NAMD // *Journal of Computational Chemistry*. – 2005. – T. 26, № 16. – C. 1781-1802.
79. Best R. B., Zhu X., Shim J., Lopes P. E. M., Mittal J., Feig M., MacKerell A. D. Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain χ_1 and χ_2 dihedral angles // *Journal of Chemical Theory and Computation*. – 2012. – T. 8, № 9. – C. 3257-3273.
80. Eswar N., Webb B., Marti-Renom M. A., Madhusudhan M. S., Eramian D., Shen M. Y., Pieper U., Sali A. Comparative protein structure modeling using Modeller // *Curr Protoc Bioinformatics*. – 2006. – T. Chapter 5. – C. Unit-5 6.
81. Word J. M., Lovell S. C., LaBean T. H., Taylor H. C., Zalis M. E., Presley B. K., Richardson J. S., Richardson D. C. Visualizing and quantifying molecular goodness-of-fit: small-probe contact dots with explicit hydrogen atoms // *J Mol Biol*. – 1999. – T. 285, № 4. – C. 1711-33.
82. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics // *Journal of Molecular Graphics*. – 1996. – T. 14, № 1. – C. 33-38.
83. Chandler D. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly // *Nature*. – 2005. – T. 437, № 7059. – C. 640-7.
84. E K. Crystal contacts as nature's docking solutions. // *J Comput Chem*. – 2010. – T. 31. – C. 133-143.
85. Morris G. M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M. F., Belew R. K., Goodsell D. S., Olson A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility // *Journal of Computational Chemistry*. – 2009. – T. 30, № 16. – C. 2785-2791.
86. Jiménez-García B., Pons C., Fernández-Recio J. pyDockWEB: a web server for rigid-body protein-protein docking using electrostatics and desolvation scoring // *Bioinformatics*. – 2013. – T. 29, № 13. – C. 1698-1699.
87. Ashbaugh H. S., Kaler E. W., Paulaitis M. E. A. "Universal" surface area correlation for molecular hydrophobic phenomena. // *J. Am. Chem. Soc.* . – 1999. – T. 121. – C. 9243-9244.

88. Wagoner J. A., Baker N. A. Assessing implicit models for nonpolar mean solvation forces: the importance of dispersion and volume terms // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – T. 103, № 22. – C. 8331-6.
89. Kortemme T., Kim D. E., Baker D. Computational alanine scanning of protein-protein interfaces // *Sci STKE.* – 2004. – T. 2004, № 219. – C. pl2.
90. Ramadoss V., Dehez F., Chipot C. AlaScan: A Graphical User Interface for Alanine Scanning Free-Energy Calculations // *J Chem Inf Model.* – 2016. – T. 56, № 6. – C. 1122-6.
91. Shirts M. R., Mobley D. L., Chodera J. D. Chapter 4 Alchemical Free Energy Calculations: Ready for Prime Time? // – 2007. – T. 3. – C. 41-59.
92. Bowman G. R., Huang X., Pande V. S. Network models for molecular kinetics and their initial applications to human health // *Cell Res.* – 2010. – T. 20, № 6. – C. 622-30.
93. Scherer M. K., Trendelkamp-Schroer B., Paul F., Perez-Hernandez G., Hoffmann M., Plattner N., Wehmeyer C., Prinz J. H., Noe F. PyEMMA 2: A Software Package for Estimation, Validation, and Analysis of Markov Models // *J Chem Theory Comput.* – 2015. – T. 11, № 11. – C. 5525-42.
94. Fixman M. Radius of Gyration of Polymer Chains // *The Journal of Chemical Physics.* – 1962. – T. 36, № 2. – C. 306-310.
95. Perez-Hernandez G., Paul F., Giorgino T., De Fabritiis G., Noe F. Identification of slow molecular order parameters for Markov model construction // *J Chem Phys.* – 2013. – T. 139, № 1. – C. 015102.
96. Naritomi Y., Fuchigami S. Slow dynamics in protein fluctuations revealed by time-structure based independent component analysis: the case of domain motions // *J Chem Phys.* – 2011. – T. 134, № 6. – C. 065101.
97. Li Y., Dong Z. Effect of Clustering Algorithm on Establishing Markov State Model for Molecular Dynamics Simulations // *J Chem Inf Model.* – 2016. – T. 56, № 6. – C. 1205-15.
98. Swope W. C., Pitera J. W., Suits F., Pitman M., Eleftheriou M., Fitch B. G., Germain R. S., Rayshubski A., Ward T. J. C., Zhestkov Y., Zhou R. Describing protein folding kinetics by molecular dynamics simulations. 2. Example applications to alanine

dipeptide and beta-hairpin peptide // *Journal of Physical Chemistry B.* – 2004. – T. 108, № 21. – C. 6582-6594.

99. Prinz J. H., Wu H., Sarich M., Keller B., Senne M., Held M., Chodera J. D., Schutte C., Noe F. Markov models of molecular kinetics: generation and validation // *J Chem Phys.* – 2011. – T. 134, № 17. – C. 174105.

100. Roblitz S., Weber M. Fuzzy spectral clustering by PCCA plus : application to Markov state models and data classification // *Advances in Data Analysis and Classification.* – 2013. – T. 7, № 2. – C. 147-179.

101. Noe F., Schutte C., Vanden-Eijnden E., Reich L., Weikl T. R. Constructing the equilibrium ensemble of folding pathways from short off-equilibrium simulations // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. – T. 106, № 45. – C. 19011-6.

102. Metzner P., Schutte C., Vanden-Eijnden E. Transition Path Theory for Markov Jump Processes // *Multiscale Modeling & Simulation.* – 2009. – T. 7, № 3. – C. 1192-1219.

103. Roux B. The Calculation of the Potential of Mean Force Using Computer-Simulations // *Computer Physics Communications.* – 1995. – T. 91, № 1-3. – C. 275-282.

104. Kumar S., Bouzida D., Swendsen R. H., Kollman P. A., Rosenberg J. M. The Weighted Histogram Analysis Method for Free-Energy Calculations on Biomolecules .1. The Method // *Journal of Computational Chemistry.* – 1992. – T. 13, № 8. – C. 1011-1021.

105. Masson P. Formes moléculaires multiples de la butyrylcholinestérase du plasma humain I. Paramètres moléculaires apparents et ébauche de la structure quaternaire // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure.* – 1979. – T. 578, № 2. – C. 493-504.

106. Sola R. J., Rodriguez-Martinez J. A., Griebenow K. Modulation of protein biophysical properties by chemical glycosylation: biochemical insights and biomedical implications // *Cell Mol Life Sci.* – 2007. – T. 64, № 16. – C. 2133-52.

107. Mallajosyula S., Jo S., Im W., MacKerell A., Jr. Molecular Dynamics Simulations of Glycoproteins Using CHARMM // *Glycoinformatics / Lütke T., Frank M. Springer New York, 2015.* – C. 407-429.

108. Bernardi A., Kirschner K. N., Faller R. Structural analysis of human glycoprotein butyrylcholinesterase using atomistic molecular dynamics: The importance of glycosylation site ASN241 // PLoS One. – 2017. – T. 12, № 11. – C. e0187994.
109. Kraut D., Goff H., Pai R. K., Hosea N. A., Silman I., Sussman J. L., Taylor P., Voet J. G. Inactivation studies of acetylcholinesterase with phenylmethylsulfonyl fluoride // Mol Pharmacol. – 2000. – T. 57, № 6. – C. 1243-8.
110. Chandar N. B., Efremenko I., Silman I., Martin J. M. L., Sussman J. L. Molecular Dynamics Simulations of the Interaction of Mouse and Torpedo Acetylcholinesterase with Covalent Inhibitors Explain Their Differential Reactivity: Implications for Drug // – 2019.10.1101/532754.
111. Birks J. S., Chong L. Y., Grimley Evans J. Rivastigmine for Alzheimer's disease // Cochrane Database Syst Rev. – 2015. – T. 9. – C. CD001191.
112. Main A. R. Mode of action of anticholinesterases // Pharmacology & Therapeutics. – 1979. – T. 6, № 3. – C. 579-628.
113. Millard C. B., Lockridge O., Broomfield C. A. Design and expression of organophosphorus acid anhydride hydrolase activity in human butyrylcholinesterase // Biochemistry. – 1995. – T. 34, № 49. – C. 15925-15933.
114. Word J. M., Lovell S. C., Richardson J. S., Richardson D. C. Asparagine and glutamine: using hydrogen atom contacts in the choice of side-chain amide orientation // Journal of Molecular Biology. – 1999. – T. 285, № 4. – C. 1735-1747.
115. Gasteiger J., Marsili M. A new model for calculating atomic charges in molecules // Tetrahedron Letters. – 1978. – T. 19, № 34. – C. 3181-3184.
116. O'Boyle N., Banck M., James C., Morley C., Vandermeersch T., Hutchison G. Open Babel: an open chemical toolbox // Journal of Cheminformatics. – 2011. – T. 3, № 1. – C. 33.
117. McWeeny R. Charge Densities in Conjugated Systems // The Journal of Chemical Physics. – 1951. – T. 19, № 12. – C. 1614-1615.
118. Granovsky A. A. <http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html> // Book <http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html> .

119. Francisco J. Solis R. J.-B. W. Minimization by random search techniques // *Mathematics of Operations Research*. – 1981. – Т. 6, № 1. – С. 19-30.
120. Vanommeslaeghe K., MacKerell A. D., Jr. CHARMM additive and polarizable force fields for biophysics and computer-aided drug design // *Biochim Biophys Acta*. – 2015. – Т. 1850, № 5. – С. 861-71.
121. Vanommeslaeghe K., MacKerell A. D., Jr. Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) I: bond perception and atom typing // *J Chem Inf Model*. – 2012. – Т. 52, № 12. – С. 3144-54.
122. Vanommeslaeghe K., Raman E. P., MacKerell A. D., Jr. Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: assignment of bonded parameters and partial atomic charges // *J Chem Inf Model*. – 2012. – Т. 52, № 12. – С. 3155-68.
123. Воеводин В. В., Жуматий С. А., Соболев С. И., Антонов А. С., Брызгалов П. А., Никитенко Д. А., Стефанов К. С., Воеводин В. В. Практика суперкомпьютера "Ломоносов" // *Открытые системы*. – 2012. № 7. – С. 36-39.
124. Valiev M., Bylaska E. J., Govind N., Kowalski K., Straatsma T. P., Van Dam H. J. J., Wang D., Nieplocha J., Apra E., Windus T. L., de Jong W. A. NWChem: A comprehensive and scalable open-source solution for large scale molecular simulations // *Computer Physics Communications*. – 2010. – Т. 181, № 9. – С. 1477-1489.
125. Doshi U., Hamelberg D. Reoptimization of the AMBER force field parameters for peptide bond (Omega) torsions using accelerated molecular dynamics // *J Phys Chem B*. – 2009. – Т. 113, № 52. – С. 16590-5.
126. Химическая Энзимология. / Варфоломеев С. Д. – Москва: Академия, 2005. – 480 с.
127. Tormos J. R., Wiley K. L., Seravalli J., Nachon F., Masson P., Nicolet Y., Quinn D. M. The reactant state for substrate-activated turnover of acetylthiocholine by butyrylcholinesterase is a tetrahedral intermediate // *J Am Chem Soc*. – 2005. – Т. 127, № 42. – С. 14538-9.
128. Tormos J. R., Wiley K. L., Wang Y., Fournier D., Masson P., Nachon F., Quinn D. M. Accumulation of tetrahedral intermediates in cholinesterase catalysis: a secondary isotope effect study // *J Am Chem Soc*. – 2010. – Т. 132, № 50. – С. 17751-9.

129. Broomfield C. A., Millard C. B., Lockridge O., Caviston T. L. Mutation of human butyrylcholinesterase glycine 117 to histidine preserves activity but confers resistance to organophosphorus inhibitors // *Enzymes of the Cholinesterase Family*. – 1995. – C. 169-175.
130. Masson P., Lushchekina S. V. Emergence of catalytic bioscavengers against organophosphorus agents // *Chemico-Biological Interactions*. – 2016. – T. 259, № Pt B. – C. 319-326.
131. 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 // *Chem Biol Interact*. – 2019. – T. 306. – C. 138-146.
132. Nicolet Y., Lockridge O., Masson P., Fontecilla-Camps J. C., Nachon F. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – T. 278, № 42. – C. 41141-41147.
133. Driant T., Nachon F., Ollivier C., Renard P. Y., Derat E. On the Influence of the Protonation States of Active Site Residues on AChE Reactivation: A QM/MM Approach // *Chembiochem*. – 2017. – T. 18, № 7. – C. 666-675.
134. Delacour H., Lushchekina S., Mabboux I., Bousquet A., Ceppa F., Schopfer L. M., Lockridge O., Masson P. Characterization of a Novel *BCHE* “Silent” Allele: Point Mutation (p.Val204Asp) Causes Loss of Activity and Prolonged Apnea with Suxamethonium // *PLoS ONE*. – 2014. – T. 9, № 7. – C. e101552.
135. Lushchekina S., Nemukhin A., Varfolomeev S., Masson P. Understanding the non-catalytic behavior of human butyrylcholinesterase silent variants: comparison of wild-type enzyme, catalytically active Ala328Cys mutant, and silent Ala328Asp variant // *Chemico-Biological Interactions*. – 2016. – T. 259, № Pt B. – C. 223-232.
136. Lushchekina S. V., Nemukhin A. V., Varfolomeev S. D., Masson P. Molecular modeling evidence for His438 flip in the mechanism of butyrylcholinesterase hysteretic behavior // *Journal of Molecular Neuroscience*. – 2014. – T. 52, № 3. – C. 434-45.