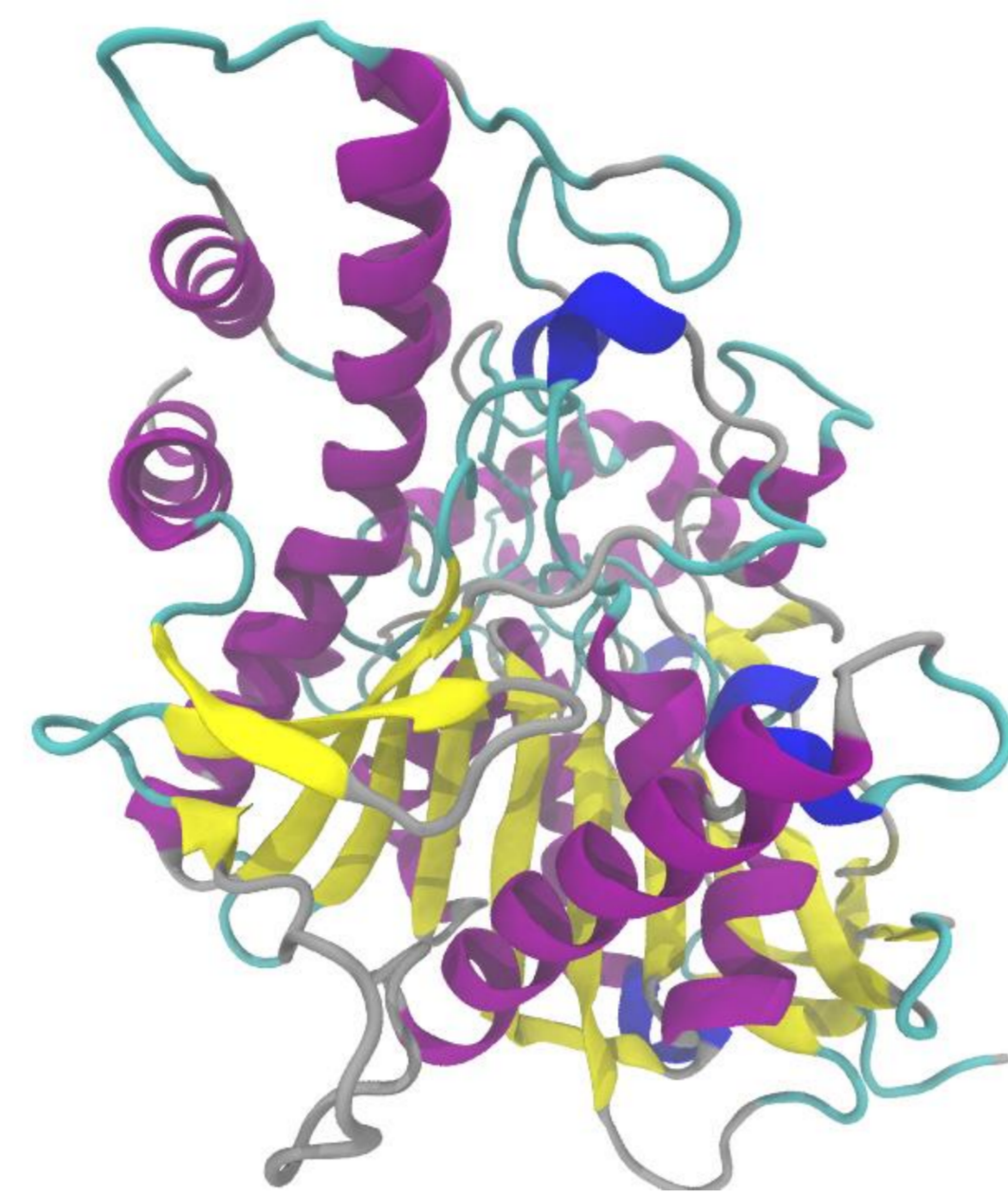




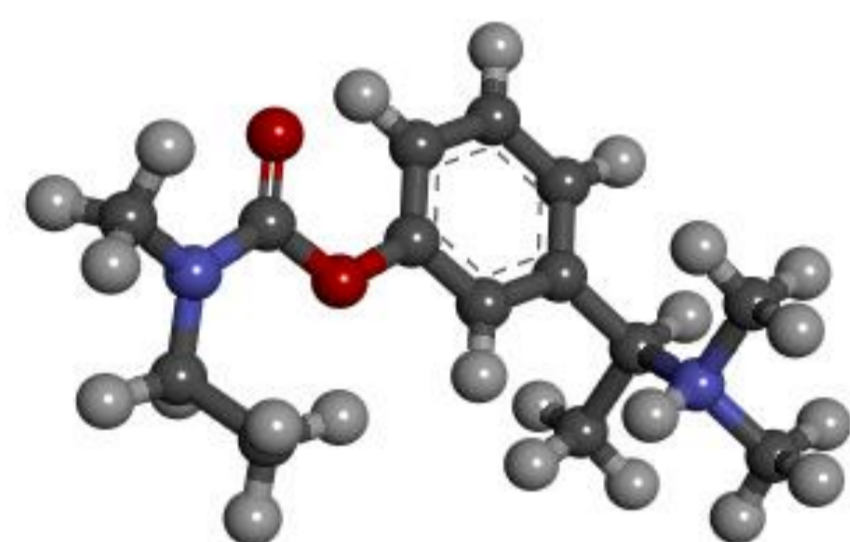
Введение

Ацетилхолинэстераза

- Ключевой фермент ЦНС, гидролизует нейромедиатор ацетилхолин. Необратимое ингибирование АХЭ приводит к судорогам и часто летально. Обратимое ингибирование АХЭ используется для терапии различных болезней (например, болезни Альцгеймера)
- Сериновая гидролаза, **строение каталитической триады одинаково для всех видов**
- Каталитически «совершенный» фермент: $k_{cat}/K_M \sim 2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
- Каталитические свойства АХЭ по отношению к ацетилхолину одинаковы, при этом существуют ингибиторы, селективные по отношению к АХЭ различных видов (ривастигмин)
- Активный сайт находится на дне узкого канала длиной 20 Å. Выстилающие канал остатки сохраняются в 90% случаев при сравнении АХЭ человека и АХЭ рыбы (*Torpedo californica*). **Особый интерес представляет транспорт субстрата по каналу.**



Ривастигмин



- Применяется для лечения болезни Альцгеймера
- Очень медленное ингибирование рАХЭ (в 1600 раз медленнее, чем у хАХЭ)
- Медленная реактивация во всех видах (есть незначительные нюансы), у рАХЭ – САМАЯ медленная
- Нет явных конформационных изменений
- Уходящая группа обратимо ингибирует ацетилхолинэстеразу
- Замена уходящей группы на Cl приводит к ковалентному ингибированию с мгновенной реактивацией

Цели и задачи

Цель работы – выяснить, с какими особенностями строения холинэстераз человека и рыбы связаны различия в кинетике связывания ривастигмина



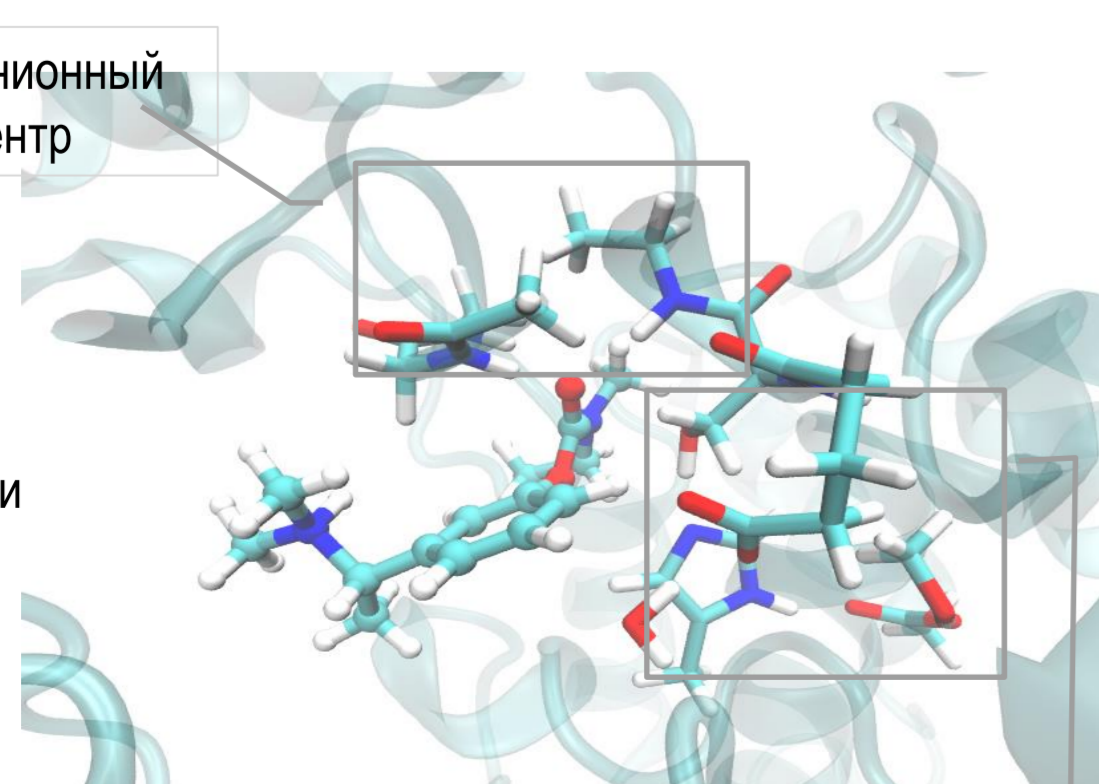
Различия каталитических свойств

Задачи:

- Построение профиля свободной энергии перемещения ривастигмина по каналу для описания взаимодействия ривастигмина с остатками, устилающими канал (молекулярная динамика, метод зонтичной выборки с обменом Гамильтонианами)
- Квадратомеханическое моделирование образования тетраэдрического интермедиата на стадии ацилирования фермента для оценки конформационных изменений в активном сайте

Протокол расчёта

- NWChem 6.0
- 122 атома КМ части (cc-pvdz/pbe0)
- 12000 атомов ММ части (amber)

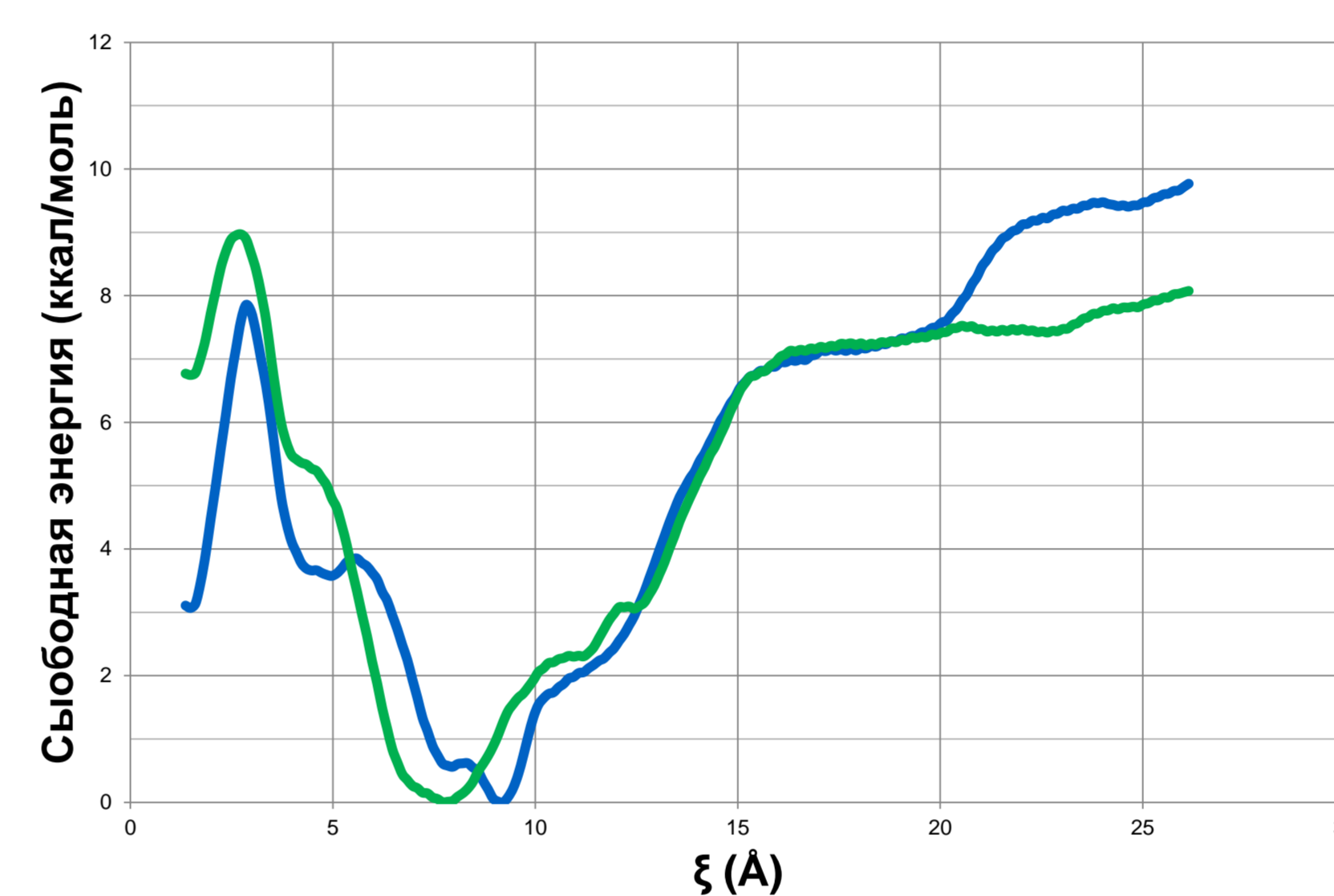
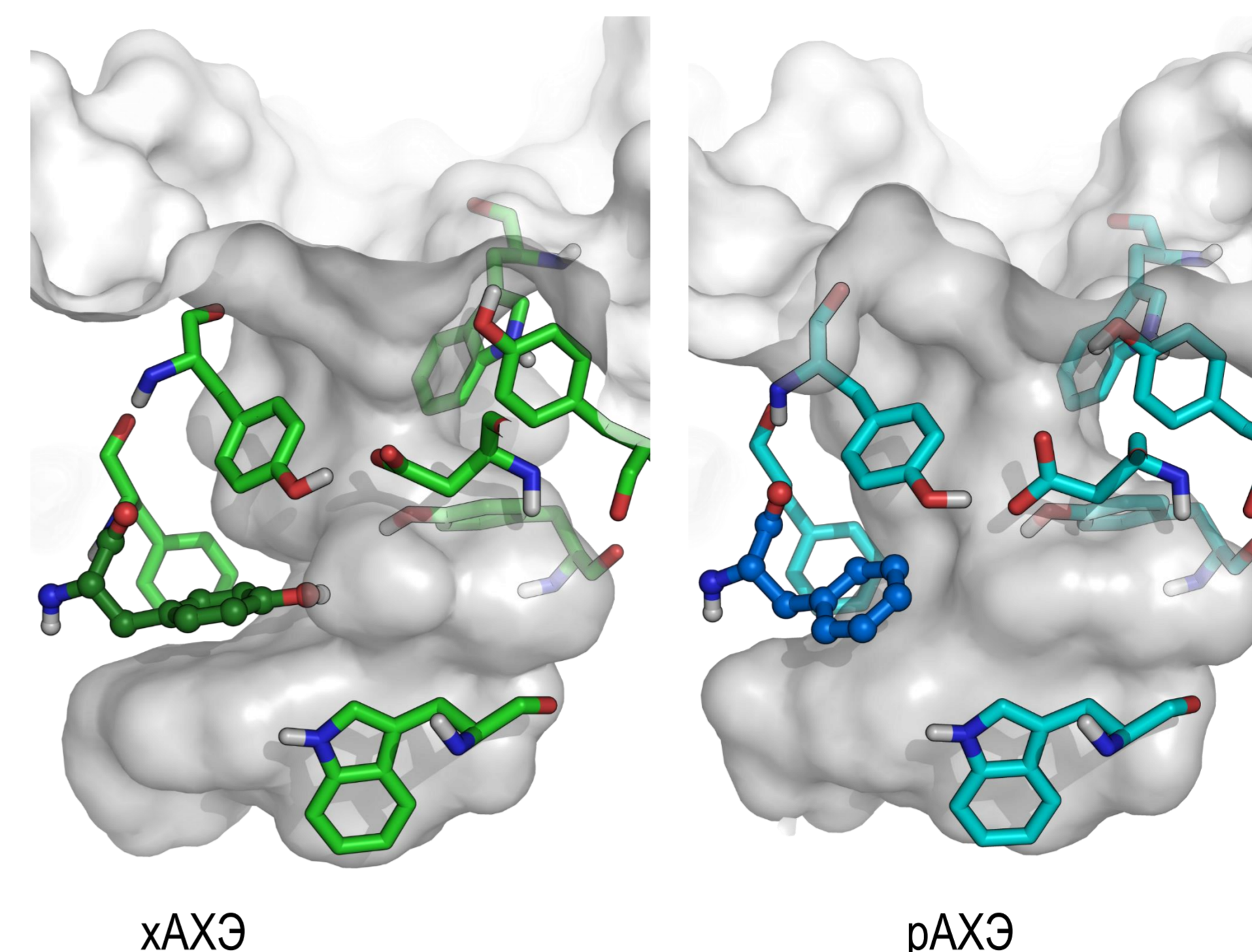


Каталитическая триада

Молекулярная динамика, метод зонтичной выборки с обменом Гамильтонианами:

- Коллективная переменная – расстояние от амидной группы до активного сайта фермента
- 100 окон
- $K=25 \text{ ккал/моль}$
- 20 нс на каждую реплику
- Метод взвешенных гистограмм для расчёта свободной энергии

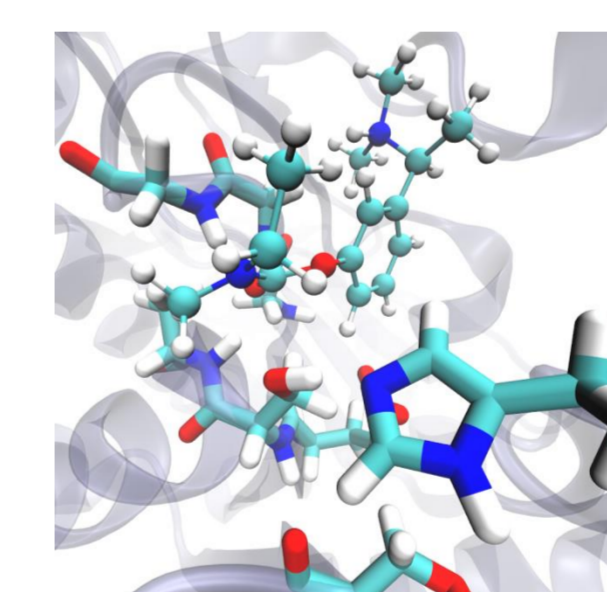
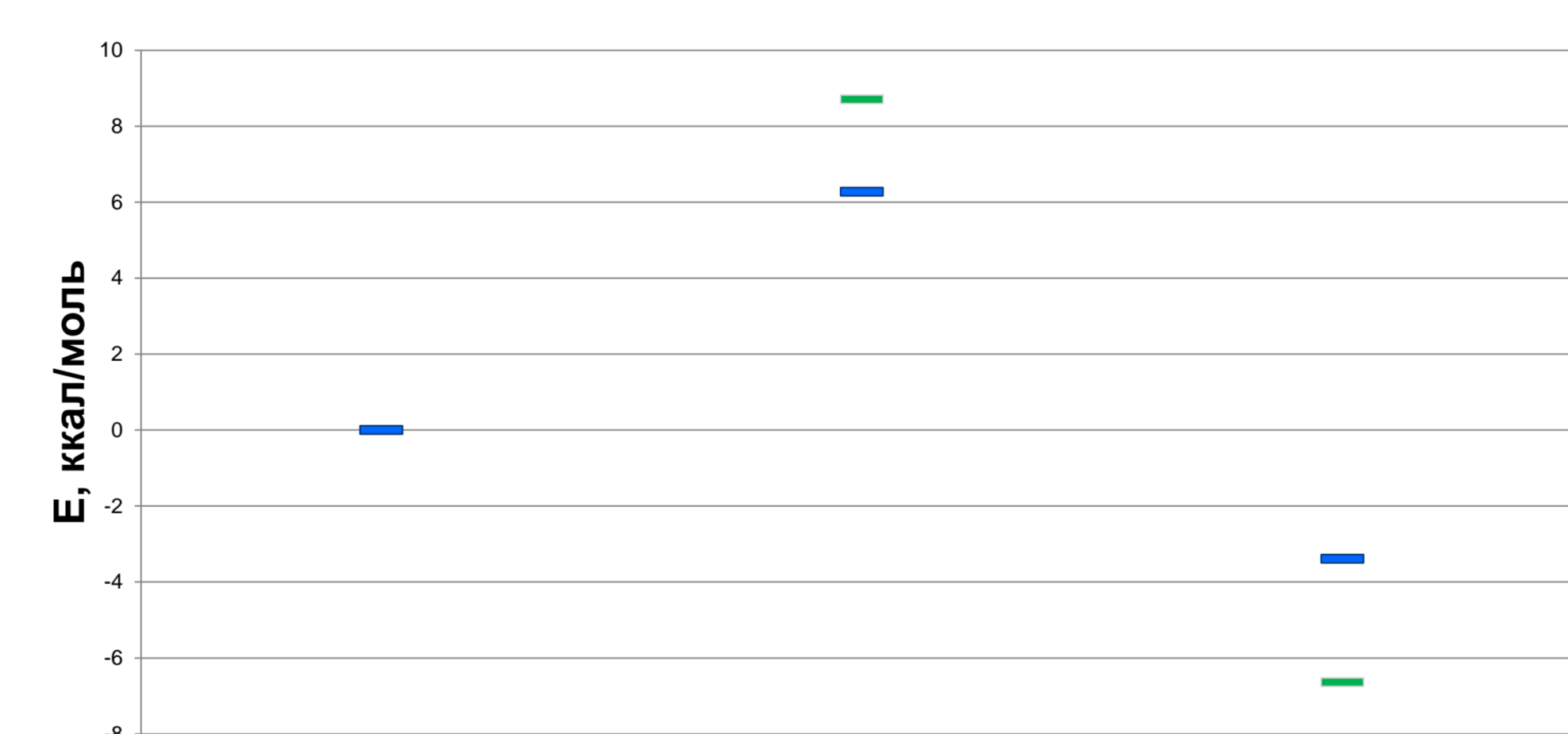
Перемещение ривастигмина по каналу



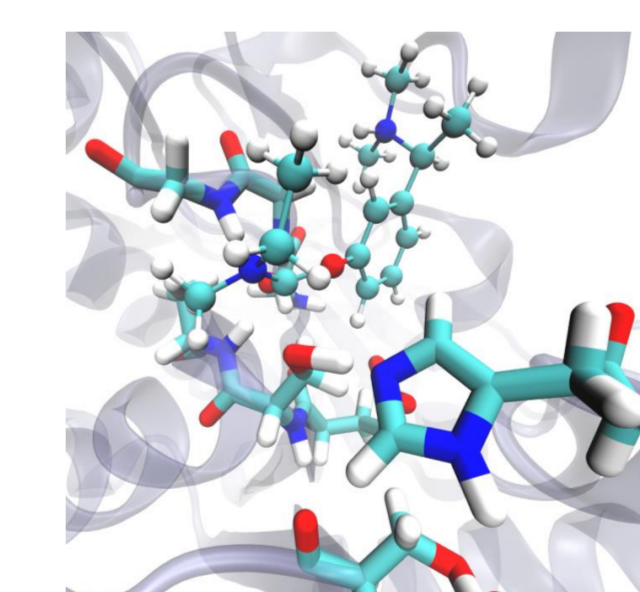
- хАХЭ имеет более короткий канал, чем рАХЭ, а также не имеет дополнительного сужения у входа в канал, что может являться причиной различий в кинетике ингибирования
- Замена F330Y в хАХЭ по сравнению с рАХЭ приводит к большему взаимодействию ривастигмина с остатками канала
- Согласно рассчитанному профилю свободной энергии, барьер прохождения ривастигмином через
- Через наиболее узкую часть канала составил 8 ккал/моль для рАХЭ и 9 ккал/моль для хАХЭ, а $\Delta G_0 = -7$ ккал/моль для рАХЭ и 1 ккал/моль для хАХЭ
- Примечательно, что барьер выхода ривастигмина из активного сайта составляет 5 ккал/моль для рАХЭ и 2 ккал/моль для хАХЭ
- Таким образом, связывание ривастигмина рАХЭ оказывается более энергетически выгодным, чем хАХЭ, при этом выход ривастигмина из активного сайта хАХЭ облегчён по сравнению с выходом из активного сайта рАХЭ

Результаты произведённых расчётов объясняют экспериментальные данные по сложности реактивации рАХЭ, ингибированной ривастигмином

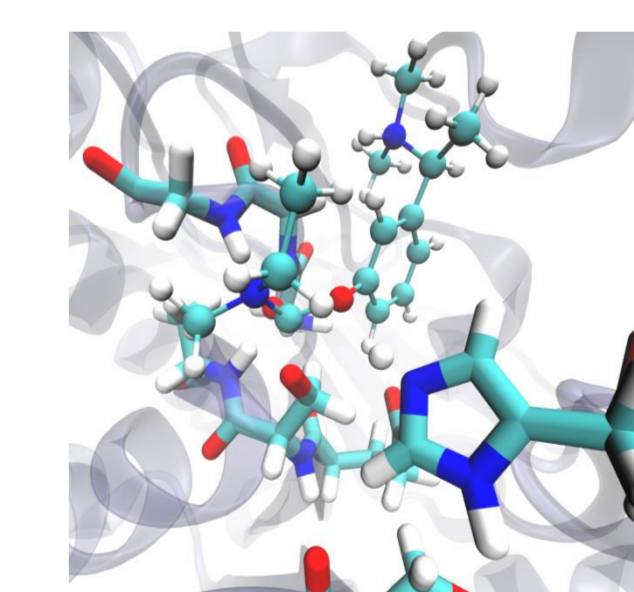
КМ/ММ расчёт ППЭ: стадия ацилирования



Фермент-субстратный комплекс



Переходное состояние



Тетраэдрический интермедиат

Выводы

- рАХЭ имеет более короткий канал, чем хАХЭ, а также не имеет дополнительного сужения у входа в канал, что может являться причиной различий в кинетике ингибирования.
- Влияние отдалённых от активного сайта аминокислот приводит к различию в профиле потенциальной энергии реакции образования тетраэдрического интермедиата.

Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-03-00043). Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.