

УДК 577.338

ЭЛЕКТРОННЫЕ СТЕРИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ МЕТАЛЛО- β -ЛАКТАМАЗЫ И РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ ЦЕФАЛОСПОРИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

М.Г. Хренова^{1,2*}, А.В. Томилко³, В.Г. Цирельсон^{1,3}

(¹ФИЦ Биотехнологии Российской академии наук; ²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; ³Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева; *e-mail: wasabiko@lcc.chem.msu.ru)

Представлены результаты изучения взаимосвязи электронных стерических факторов в активном центре металло- β -лактамазы и реакционной способности антибиотиков цефалоспоринового ряда. Стерическая энергия атома кислорода, образующего временную ковалентную связь в структуре переходного состояния лимитирующей стадии, характеризует реакционную способность соединений. Предложена линейная зависимость между этой величиной и макроскопическим параметром стационарной кинетики Михаэлиса–Ментен – каталитической константой k_{cat} (увеличение константы скорости связано с увеличением стерической энергии). Проанализированы распределения стерического потенциала и плотности стерической энергии электронов.

Ключевые слова: цефалоспориновые антибиотики, металло- β -лактамазы, гидролиз, КМ/ММ, электронные стерические эффекты, стерическая энергия.

Изучение механизмов ферментативных реакций в рамках суперкомпьютерного моделирования комбинированным методом квантовой механики и молекулярной механики (КМ/ММ) становится все более доступным. Расчеты позволяют определить порядок следования элементарных стадий реакции, их энергетические барьеры и относительные энергии интермедиатов. В качестве основной характеристики рассматриваемой системы используется ее полная энергия, состоящая из вкладов квантово-механической (КМ), молекулярно-механической (ММ) подсистем и энергии их взаимодействия. К настоящему моменту не проведено систематического изучения возможных ошибок в оценке энергетических барьеров, связанных с двумя последними членами. Ошибка определения энергии КМ подсистемы при изучении процессов на поверхности основного электронного состояния составляет порядка 2–5 ккал/моль для современных гибридных функционалов теории функционала плотности [1]. Переводя эти значения в шкалу констант скорости, получаем разброс в 30–4000 раз при комнатной температуре. Безусловно, при молекулярном моделировании выбираются те функционалы, которые лучше описывают именно интересующий тип реакции. В рамках изучения механизма химической реакции одного субстрата с одним ферментом также происходит частичная компенсация ошибок. На практике зачастую это

приводит к результатам, близким к экспериментальным данным [2–4]. Однако при изучении набора похожих реакций, например для серии родственных соединений в активном центре одного фермента, возникают сложности, вызывающие необходимость использования других критериев оценки реакционной способности. Ферментативные реакции с этой точки зрения практически не изучены, однако существует хорошо разработанный понятийный аппарат для того, чтобы характеризовать реакционную способность малых молекул в газовой фазе. Один из таких подходов основан на количественной оценке стерического эффекта – широко распространенного и интуитивно понятного термина в химии. Это явление связано с тем, что каждый атом занимает определенный объем и при образовании молекул, молекулярных комплексов и кристаллов возникают стерические затруднения, приводящие к изменению формы, энергии и реакционной способности взаимодействующих частиц.

В работе [5] предложен способ количественной оценки стерической составляющей энергии на основе перегруппировки членов в выражении для полной энергии системы в методе функционала плотности в виде:

$$E[\rho] = E_s[\rho] + E_e[\rho] + E_q[\rho],$$

где $E_s[\rho]$, $E_e[\rho]$ и $E_q[\rho]$ – компоненты энергии,

описывающие вклады стерических, электростатических и квантовых эффектов. Квантовые эффекты складываются из обменно-корреляционного энергетического члена $E_{xc}[\rho]$ и энергии Паули

$$E_{Pauli}[\rho] = T_S[\rho] - T_W[\rho],$$

представляющей собой разность положительно определенной кинетической энергии невзаимодействующих электронов $T_S[\rho]$ и кинетической энергии Вайцзаккера $T_W[\rho]$.

Сравнивая такое представление полной электронной энергии с традиционной записью

$$E[\rho] = T_S[\rho] + E_{el}[\rho] + E_{xc}[\rho],$$

получаем, что стерическая энергия равна кинетической энергии Вайцзаккера [6]:

$$E_s[\rho] = T_W[\rho] = \frac{1}{8} \int \frac{|\nabla\rho(\mathbf{r})|^2}{\rho(\mathbf{r})} d\mathbf{r}.$$

Стерическая энергия в таком представлении имеет следующий физический смысл. Величина $T_W[\rho]$ определяет кинетическую энергию электронов в гипотетическом бозонном состоянии с электронной плотностью реального фермионного состояния. Этот член представляет собой энергетическую меру собственного размера системы в случае, когда квантовые и электростатические взаимодействия полностью исключены. Концепция стерического потенциала и стерической энергии электронов успешно применяется для описания конформационных

изменений в небольших молекулах [7], реакций S_N2 -типа в газовой фазе [8], взаимодействий атомных групп в кристаллах [9] и др.

В данной работе рассматривается реакция гидролиза соединений цефалоспоринового ряда в активном центре L1 металло- β -лактамазы (M β L) из бактерии *S. maltophilia*. Задача поиска надежного способа оценки констант скорости этого процесса имеет прикладное значение. Цефалоспориновые антибиотики связываются с пенициллин-связывающими белками и блокируют их функцию строительства клеточной стенки бактерии, что приводит к ее разрушению. Однако β -лактамазы способны гидролизовать антибиотики, а образующиеся продукты гидролиза не проявляют себя как ингибиторы пенициллин-связывающих белков. Возникает задача разработки новых соединений, которые медленно гидролизуются или не гидролизуются β -лактамазами. Реакция гидролиза цефалоспориновых соединений L1 M β L проходит через три элементарные стадии [2]. Последняя стадия (лимитирующая), согласно экспериментальным данным [10], определяет скорость всего процесса. Она включает в себя перенос протона с аспарагиновой кислоты активного центра на атом азота субстрата, а в структуре переходного состояния образуется временная ковалентная связь атома кислорода субстрата и переносимого протона (рис. 1). Экспериментальные значения каталитических констант изменяются в пределах двух порядков, т.е. их различия попадают в коридор ошибок метода КМ/ММ.

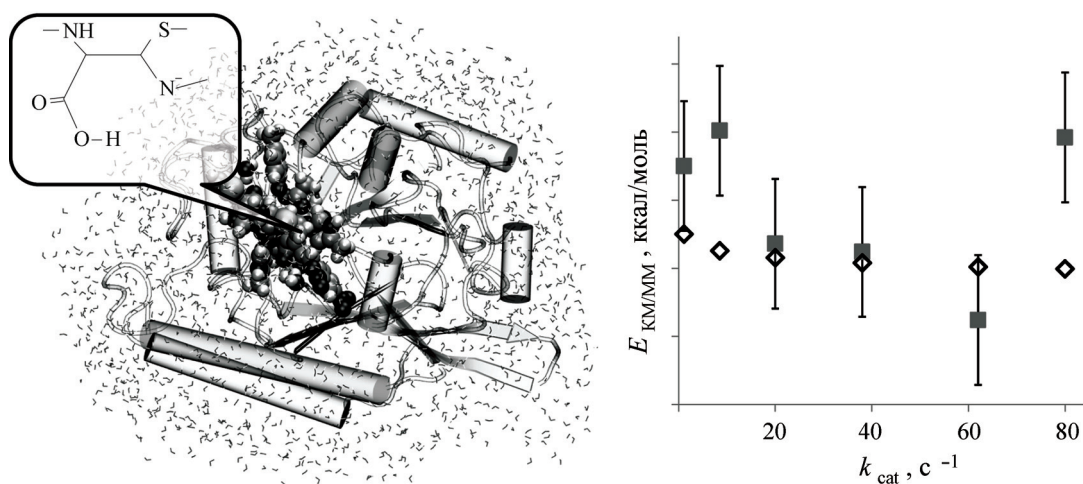


Рис. 1. Слева молекулярная модель для расчетов методом КМ/ММ. КМ-подсистема показана Ван-дер-Ваальсовыми сферами, молекулы воды – линиями, белковая макромолекула – схематично прозрачными лентами и цилиндрами; во врезке показана структура антибиотика в переходном состоянии лимитирующей стадии. Справа рассчитанные методом КМ/ММ энергетические барьеры (квадраты) и экспериментальные значения энергетических барьеров (ромбы), полученные из k_{cat} по теории переходного состояния. Коридор ошибок для рассчитанных значений взят из работы [1] и составляет 4,76 ккал/моль

Цель работы – определение ключевых взаимодействий и свойств атомов в молекулярных системах в рамках концепции стерического потенциала и стерической энергии электронов. Под ключевыми взаимодействиями и свойствами следует понимать те из них, которые определяют макроскопические свойства системы; в данном случае это каталитическая константа стационарной кинетики Михаэлиса–Ментен (k_{cat}).

На основании результатов изучения механизма реакции окрашенного цефалоспоринового субстрата нитроцефина в активном центре L1 MβL [2] построены молекулярные модели еще пяти комплексов фермент–антибиотик. В качестве антибиотиков были выбраны цефокситин ($k_{\text{cat}} = 1,1 \text{ с}^{-1}$), CGP-17520A ($k_{\text{cat}} = 8,5 \text{ с}^{-1}$), CGP-31523A ($k_{\text{cat}} = 38 \text{ с}^{-1}$), цефалоспорин С ($k_{\text{cat}} = 62 \text{ с}^{-1}$) и цефуроксим ($k_{\text{cat}} = 80 \text{ с}^{-1}$) [10, 11]. Для каждой из модельных систем проводили замену нитроцефина на один из изучаемых антибиотиков. Так были получены 6 модельных систем (рис. 1), в которых с помощью метода КМ/ММ в варианте PBE0-D3/cc-pvdz/AMBER проводили поиск переходного состояния лимитирующей стадии реакции (TS), аналогично проведенному в работе [2]. Далее проводили спуск в минимум, соответствующий интермедиату (Int) реакции, предшествующему лимитирующей стадии.

Для полученных систем проводили расчет энергетических барьеров. Из рис. 1 видно, что монотонная зависимость между экспериментальными значениями констант скорости (k_{cat}) и рассчитанными барьерами лимитирующей стадии отсутствует. Прямое сопоставление эффективного параметра k_{cat} с константами скорости элементарных стадий – задача в общем случае не тривиальная. Однако в работе [2] показано, что для данной реакции эффективная константа скорости всего процесса в целом определяется исключительно константой скорости лимитирующей стадии в прямом направлении. Поэтому правомерно определение барьера лимитирующей стадии из экспериментальной константы скорости по теории переходного состояния. Из рис. 1 видно, что диапазон изменения энергетических барьеров, полученных из k_{cat} , значительно уже, чем для рассчитанных значений. Часть экспериментальных значений попадает в коридор ошибок рассчитанных величин, взятых из работы [1], часть – нет. Однако на основании этого нельзя считать метод КМ/ММ неправильным, полученные результаты лишь указывают на необходимость их более тщательного анализа. В частности, для систем с наибольшими различиями между экспериментальными

и рассчитанными энергетическими барьерами наблюдается значительное изменение энергетического вклада от ММ части между стационарными точками, что вносит дополнительную неконтролируемую ошибку. В случае, когда изучается одна химическая реакция, проводится множество расчетов с варьированием и выбором оптимальной КМ-подсистемы. Тщательно контролируются все энергетические вклады в полную энергию системы и проводится множество дополнительных расчетов для полной релаксации системы, в том числе и шапки из молекул воды, окружающей белок. В этом случае удается получить рассчитанные параметры, которые хорошо согласуются с экспериментом. Так, например, в случае гидролиза нитроцефина экспериментально оцененный энергетический барьер составляет 15,7 ккал/моль, а рассчитанный – 16,8 ккал/моль [2].

Перейдем к детальному анализу микроскопических свойств активного центра в структуре переходного состояния в области водородной связи O–H...N (рис. 1): плотности стерической энергии, стерического потенциала и значений стерической энергии, рассчитанных для отдельных атомов, определяемых по рецепту квантовой теории атомов в молекулах Бейдера [13]. Согласно работе [5], стерический потенциал определяется как производная стерической энергии по электронной плотности $\rho(\mathbf{r})$:

$$v_s(\mathbf{r}) = \frac{\delta E_s[\rho]}{\delta \rho} = \frac{1}{8} \frac{|\nabla \rho(\mathbf{r})|^2}{\rho^2(\mathbf{r})} - \frac{1}{4} \frac{\nabla^2 \rho(\mathbf{r})}{\rho(\mathbf{r})}.$$

Градиент стерического потенциала, взятый с обратным знаком, определяет стерическую силу, действующую на инфинитезимальный объем электронной плотности в точке \mathbf{r} , а силовое поле показывает пространственное распределение напряжения в молекулярной системе, вызванное стерическим (т.е. объемным) фактором.

На рис. 2 представлены двумерные карты электронного стерического потенциала и соответствующие векторные силовые поля для структур переходного состояния с самым быстрым (цефуроксим) и медленным (цефокситим) из рассматриваемых субстратов. Из карт видно, что стерические силы действуют на электроны в направлении ядер, просматриваются межатомные границы, где направление сил меняется. Положительные значения стерического потенциала показывают области, где электрон может находиться в классическом смысле. Отрицательные области стерического потенциала отвечают потенциальным барьерам, где электрон проявляет квантовое поведение.

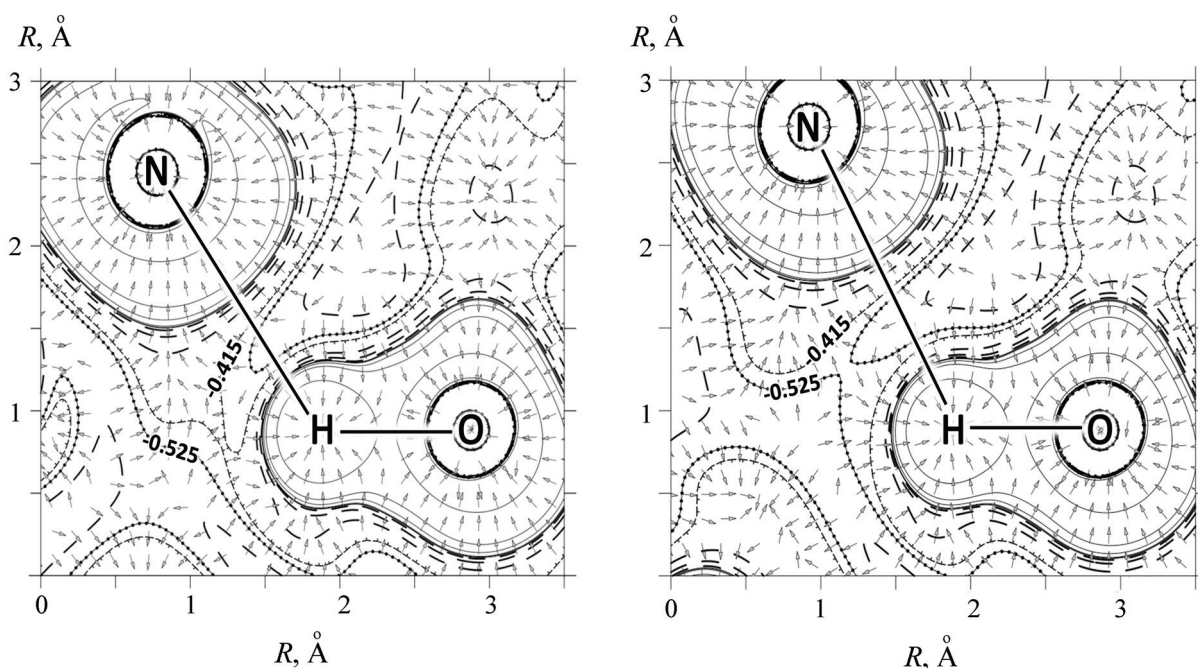


Рис. 2. Двумерные карты электронного стерического потенциала и соответствующие силовые поля в плоскости О–Н...N для структур переходного состояния с самым быстрым (цефуросим, справа) и медленным (цефокситим, слева) субстратами. Изолинии $-0,8$; $-0,2$; $-0,08$; $-0,02$ показаны пунктиром; $0,002$; $0,008$; $0,02$; $0,08$; $0,2$; $0,8$ – сплошными, контурные линии $-0,525$ и $-0,415$ выделены фигурными линиями. Стрелками показаны стерические силы, действующие на электроны. Здесь и на следующем рисунке все значения приведены в атомных единицах

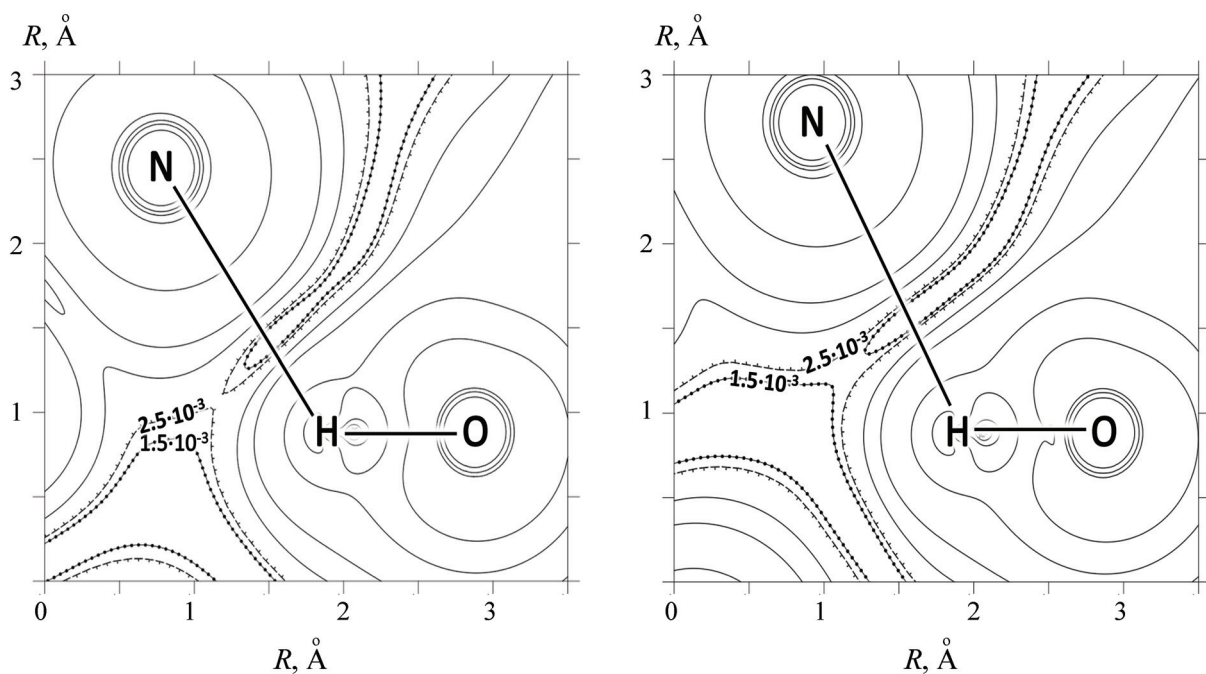


Рис. 3. Двумерные карты плотности стерической энергии в плоскости О–Н...N для структур переходного состояния с самым быстрым (цефуросим, справа) и медленным (цефокситим, слева) субстратами. Изолинии $0,008$; $0,02$; $0,08$; $0,2$; $0,8$; 2 ; 8 показаны сплошными линиями, контурные линии $0,0015$ и $0,0025$ выделены фигурными линиями

Соответственно, области более отрицательного потенциала создают стерические затруднения (барьеры), препятствуя движению электрона.

При сравнении карт стерического потенциала быстрого и медленного субстратов отчетливо видны различия в области водородной связи. Для медлен-

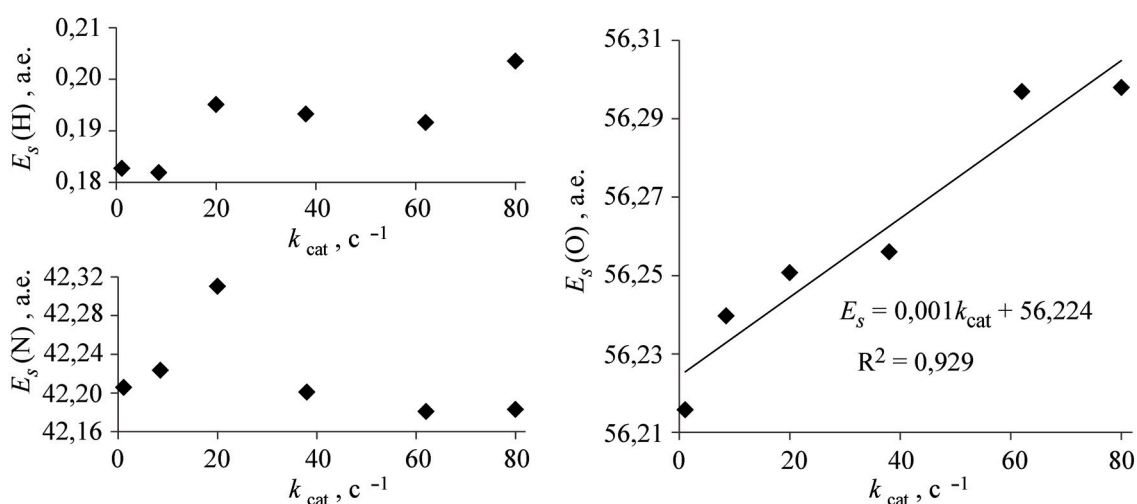


Рис. 4. Взаимосвязи наблюдаемой каталитической константы k_{cat} и стерической энергии атомов О (справа), N (слева внизу) и Н (слева вверху) в структуре переходного состояния лимитирующей стадии для шести модельных систем L1 МБЛ – цефалоспориновое соединение

ного субстрата характерны менее отрицательные барьеры в районе связи N...Н и область взаимодействия между этими атомами со значениями потенциала, превышающими $-0,415$ а.е. Для быстрого субстрата водородная связь слабее, о чем свидетельствуют более отрицательные значения стерического потенциала. В частности, «канал» стерического взаимодействия характеризуется более отрицательными значениями потенциала, превышающими $-0,525$ а.е.

На рис. 3 представлены двумерные карты плотности электронной стерической энергии

$$t_w(\mathbf{r}) = \frac{1}{8} \frac{|\nabla \rho(\mathbf{r})|^2}{\rho(\mathbf{r})}$$

Для быстрого субстрата в области водородной связи N...Н наблюдаются более низкие значения плотности стерической энергии, чем для медленного субстрата, что свидетельствует о более слабых взаимодействиях в более реакционноспособных системах.

Критерием реакционной способности соединения может служить стерическая энергия атома [9]. Поэтому для всех рассматриваемых систем в структурах переходного состояния лимитирующей стадии и предшествующего интермедиата рассчитывали стерические энергии для каждого из атомов, для этого интегрировали плотность стерической энергии по атомным бассейнам. Последние в рамках квантово-топологической теории атомов в молекулах представляют собой области простран-

ства, ограниченные поверхностью нулевого потока градиента электронной плотности [13]. Ни для одного из атомов в структурах интермедиата не найдено зависимости каталитической константы от значения стерической энергии. Для структуры переходного состояния на рис. 4 приведены значения стерической энергии атомов водорода, кислорода и азота, формирующих водородную связь, обсуждаемую в работе. Видно, что только для атома кислорода наблюдается такая зависимость. Ее можно трактовать следующим образом: увеличение стерической энергии атома кислорода свидетельствует об увеличении на нем стерического напряжения. В результате ковалентная связь рвется с большей готовностью, что приводит к увеличению каталитической константы.

Таким образом, в работе показано, что стерические эффекты, количественно представленные в терминах электронной стерической энергии атома О, плотности стерической энергии и стерического потенциала, характеризуют реакционную способность цефалоспориновых соединений в активном центре L1 металло-β-лактамазы. Для более реакционноспособных соединений в структуре переходного состояния лимитирующей стадии наблюдаются области менее выгодные для нахождения электронов в области водородной связи N...Н. Стерическая энергия атома кислорода, формирующего водородную связь О-Н...N, выступает мерой реакционной способности в рассматриваемом процессе.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 18-74-10056) с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова [14].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mardirossian N., Head-Gordon M.* // Mol. Phys. 2017. Vol. 115. N 19. P. 2315.
2. *Khrenova M.G., Nemukhin A.V.* // J. Phys. Chem B. 2018. Vol. 122. N 4. P. 1378.
3. *Khrenova M.G., Grigorenko B.L., Kolomeisky A.B., Nemukhin A.V.* // J. Phys. Chem B. 2015. Vol. 119. N 40. P. 12838.
4. *Khrenova M.G., Kulakova A.M., Nemukhin A.V.* // Org. Biomol. Chem. 2018. Vol. 16. N 40. P. 7518.
5. *Liu S.B.* // J. Chem. Phys. 2007. Vol. 126. 244103: 1–5.
6. *von Weizsäcker C.F.* // Z. Phys. 1935. Vol. 96. P. 431.
7. *Liu S.B.* // J. Phys. Chem. A. 2013. Vol. 117. N 5. P. 962.
8. *Wu W.J., Wu Z.M., Rong C.Y., Lu T., Huang Y., Liu S.B.* // J. Phys. Chem. A. 2015. Vol. 119. N 29. P. 8216.
9. *Tsirelson V.G., Stash A.I., Liu S.* // J. Chem. Phys. 2010. Vol. 133. 114110: 1–6.
10. *McManus-Munoz S., Crowder M.W.* // Biochemistry. 1999. Vol. 38. N 5. P. 1547.
11. *Crowder M.W., Walsh T.R., Banovic L., Pettit M., Spencer J.* // Antimicrob. Agents Chemother. 1998. Vol. 42. N 4. P. 921.
12. *Felici A., Amicosante G.* // Antimicrob. Agents Chemother. 1995. Vol. 39. N 1. P. 192.
13. *Bader R.W.F.* Atoms in Molecules: A Quantum Theory. Oxford, 1990.
14. *Sadovnichy V., Tikhonravov A., Voevodin V., Opanasenko V.* “Lomonosov”: Supercomputing at Moscow State University. Contemp. High Perform. Comput. From Petascale Towar. Exascale. 2013. P. 283.

Поступила в редакцию 08.12.2018
 Получена после доработки 15.12.2018
 Принята к публикации 15.01.2019

ELECTRONIC STERIC FACTORS IN THE ACTIVE SITE OF METALLO- β -LACTAMASE AND REACTIVITY OF CEPHALOSPORIN ANTIBIOTICS

Khrenova M.G.^{1,2}, Tomilko A.V.³, Tsirelson V.G.^{1,3}

(¹Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences; ²Lomonosov Moscow State University; ³Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia; *e-mail: wasabiko@lcc.chem.msu.ru)

The paper presents the results of the study of the relationship of electronic steric factors in the active site of metallo- β -lactamase and reactivity of cephalosporin antibiotics. The steric energy of the oxygen atom forming a temporary covalent bond in the structure of the transition state of the limiting stage characterizes the reactivity of the compounds. A linear relationship between this value and the macroscopic parameter of the stationary kinetics of Michaelis-Menten – catalytic constant k_{cat} is proposed: the increase in the rate constant is associated with an increase in steric energy. Two-dimensional maps of steric potential and steric energy density are analyzed.

Key words: cephalosporin antibiotics, metallo- β -lactamases, hydrolysis, QM/MM, electronic steric effects, steric energy.

Сведения об авторах: Хренова Мария Григорьевна – вед. науч. сотр. лаборатории химической кибернетики кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; руководитель группы молекулярного моделирования ФИЦ Биотехнологии РАН, докт. физ.-матем. наук (khrenova.maria@gmail.com); Томилко Анастасия Викторовна – студентка кафедры квантовой химии Института химии и проблем устойчивого развития РХТУ имени Д.И. Менделеева (tominastya@gmail.com); Цирельсон Владимир Григорьевич – профессор, зав. кафедрой квантовой химии Института химии и проблем устойчивого развития РХТУ имени Д.И. Менделеева, докт. физ.-матем. наук (vtsirelson@yandex.ru).