

УДК 539.193:577.175.153

Д.А.Белинская (5 курс, каф. БФ), Н.Н.Шестакова, к.б.н., с.н.с. (ИЭФиБ РАН)

ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКТИВНОЙ СОРБЦИИ АЦЕТИЛХОЛИНА В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗ ПО ДАННЫМ ТЕОРЕТИЧЕСКОГО КОНФОРМАЦИОННОГО АНАЛИЗА

Холинэстеразы (ХЭ) принадлежат к классу сериновых гидролаз, имеют характерную “гидролазную укладку” (hydrolase fold) и консервативное строение активного центра. Типичной ацетилхолинэстеразой (АХЭ, КФ 3.1.1.7) считается ацетилхолинэстераза эритроцитов крови человека. АХЭ играет важную роль в передаче нервного импульса, гидролизует природный нейромедиатор ацетилхолин (АХ): $\text{CH}_3\text{-C(O)-O-C}^\beta\text{H}_2\text{-C}^\alpha\text{H}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$, где $\text{CH}_3\text{-C(O)}$ – ацильная часть, $\text{-O-C}^\beta\text{H}_2\text{-C}^\alpha\text{H}_2$ – холиновый фрагмент, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ – триметиламмониевая группировка.

Помимо АХЭ в организмах присутствуют и другие типы холинэстераз, например, бутирилхолинэстераза (БуХЭ, КФ 3.1.1.8). Типичной БуХЭ обычно называют бутирилхолинэстеразу сыворотки крови лошади. Функция БуХЭ до конца не изучена, хотя была выведена жизнеспособная мышь, у которой не функционировала АХЭ. Возможно, функции АХЭ при нервной передаче в этом случае выполняет БуХЭ.

В литературе имеются обширные сведения о способности холинэстераз разных видов гидролизовать эфиры-аналоги АХ. В начале XX века было обнаружено, что ХЭ являются мишенью действия фосфорорганических отравляющих веществ нервно-паралитического действия (зарин, табун и т.д.). Это обстоятельство выделило ХЭ как объект самого тщательного внимания: синтезированы и апробированы сотни веществ, являющихся субстратами и ингибиторами ХЭ, проведен рентгеноструктурный анализ кристалла АХЭ, что позволяет использовать ХЭ в качестве модели для исследования механизмов работы ферментов.

Известно, что продуктивной для гидролиза под действием АХЭ является полностью вытянутая по холиновому фрагменту конформация АХ. Целью данной работы было выявить особенности продуктивной сорбции для соединений аналогов АХ общей формулы $\text{R}_1\text{-C(O)-O-A-N}^+(\text{CH}_3)_3$ при взаимодействии с АХЭ и БуХЭ.

Расчеты параметров трехмерной структуры молекул (значения валетных и торсионных углов, объем молекул, расстояния между функционально-значимыми атомами) проводились методом молекулярной механики с помощью универсальной конформационной программы ZMM. Плотность зарядов на атомах была рассчитана с помощью программы CNDO/2. Расчет объемов молекул проводили с помощью программы Volume. Вероятность существования конформации (заселенность) оценивали по формуле: $P_i = \exp(\Delta E_i/RT) / \sum \exp(\Delta E_j/RT)$, где ΔE_k – энергия k-ого конформационного состояния, отсчитанная от глобального энергетического минимума молекулы.

Для субстратов ряда $\text{R}_1\text{-C(O)-O-C}^\beta\text{H}_2\text{-C}^\alpha\text{H}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$ корреляционный анализ подтвердил выявленную ранее зависимость между объемом молекул и скоростью их гидролиза под действием АХЭ; примечательно, что подобной зависимости в случае БуХЭ обнаружено не было. Был сделан вывод, что стерические размеры активного центра БуХЭ, по крайней мере, в районе каталитической триады и подхода к нему существенно больше, чем у АХЭ.

Было показано, что в данном ряду соединений существует достоверная корреляция между заселенностью *tt*-конформации холинового фрагмента и скоростью гидролиза

субстратов под действием АХЭ, что подтверждает продуктивность этой конформации при гидролизе под действием АХЭ. Для БуХЭ аналогичная корреляция была выявлена для tg^- -конформации.

Проведен конформационный анализ соединений с общей формулой $CH_3-C(O)-O-A-N^+(CH_3)_3$. Были отобраны конформации, которые по расстояниям между функционально значимыми атомами (карбонильный углерод, карбонильный кислород и азот) соответствуют tg^- -конформации АХ. Выявлена достоверная корреляция между их заселенностью и скоростью гидролиза под действием БуХЭ, что подтвердило продуктивность tg^- -конформации АХ при гидролизе под действием БуХЭ.

Выявлены различия в скоростях гидролиза для пар энантиомеров при одинаковых заселенностях tg^- -подобных конформаций. Это свидетельствует о том, что в активном центре БуХЭ, также как и в активном центре АХЭ, в направлении R-энантиотопных атомов водорода продуктивно сорбированного конформера АХ имеется область существенного объема фермента, откуда производится атака серина на карбонильный углерод, а со стороны S-энантиотопных атомов – область исключенного объема. Было показано, что протяженность области существенного объема у БуХЭ меньше, чем у АХЭ.