МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Коц Екатерина Дмитриевна

Молекулярное моделирование механизмов регуляции активности ферментов человека

02.00.17 – математическая и квантовая химия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель: д.х.н., проф. Немухин А.В.

Москва – 2018

Оглавление

Введение 4
Глава 1. Аспартоацилаза (hAsp)– фермент центральной нервной системы человека 10
Физиологическая функция 10
Структурные данные 11
Общие данные о структуре 12
Структура активного сайта 15
Молекулярный полиморфизм hAsp 19
Механизм каталитического гидролиза 20
Каталитическая активность hAsp 22
Глава 2. Расчёт профиля поверхности потенциальной энергии для ферментативного гидролиза NAA 24
Методы поиска стационарных состояний на поверхности потенциальной энергии ферментативной реакции 24
Методы описания ММ системы 29
Методы описания КМ подсистемы 30
Молекулярная динамика с КМ/ММ потенциалами 32
Построение профиля потенциальной энергии ферментативной реакции hAsp 32
Структура белок-субстратного комплекса 34
Реакционный путь от ES до разрыва пептидной связи 36
Разрыв связи Ns – Cs 37
Образование продуктов реакции 38
Глава 3. Полный каталитический цикл hAsp 43
Молекулярная динамика 43
Образование белок-субстратного комплекса 47
Выход продуктов реакции в раствор 47
Описание координационной сферы цинка 51
Профиль свободной энергии каталитического цикла hAsp 55
Глава 4. Влияние четвертичной структуры белка на каталитическую активность 59

Сопоставление динамических свойств мономера и димера hAsp 59
Димер апо-hAsp 61
Глава 5. Аллостерический сайт ингибирования hAsp 64
Современная концепция аллостерической регуляции 64
Поиск сайта аллостерического ингибирования hAsp 65
Молекулярная динамика hAsp:NAA(inh) 70
Динамический сетевой анализ 71
Кластерный анализ графов апо-hAsp и hAsp:NAA(inh) 71
Пути передачи сигнала от аллостерического сайта к воротам активного центра 78
Апробация предложенного механизма регуляции hAsp 79
Глава 6. Аллостерический сайт активации hAsp 81
Поиск аллостерического сайта активации 81
Глава 7. Кинетическая модель ферментативного гидролиза NAA 85
Модель состояний Маркова 85
Кинетическая модель hAsp 90
Выводы 93
Литература 94

Введение

Ферменты человека занимают особое место в молекулярном разнообразии биомакромолекул. Достаточно отметить, что ферменты являются мишенями большинства современных лекарств, и учет структуры и функции каждого фермента представляет необходимый этап становления современной медицины. На пути к персонифицированной медицине экспериментальные изучения структуры и функций ферментов человека, безусловно, являются определяющими. Однако современные информационные и вычислительные технологии обеспечивают значительную поддержку экспериментальным усилиям. Прежде всего, компьютерные расчеты позволяют не только строить полноатомную трехмерную структуру белка на основе знания первичной структуры, но и моделировать механизмы химических процессов, протекающих в ферментах. Компьютерные расчеты энергетических профилей элементарных стадий химических преобразований в многостадийных реакциях ферментативного катализа на основе методов квантовой механики – молекулярной механики (КМ/ММ) заняли прочное место в современной химической энзимологии. Подобные расчеты химических реакций в активных центрах ферментов были выполнены в работах, составляющих диссертацию, в частности, для аспартоацилазы человека (**hAsp**), важнейшего фермента центральной нервной системы [1], для ферментов зрительной системы Arl3-RP2 [2], для ферментов сигнальной системы Ras-GAP [3].

Другое направление молекулярного моделирования в химической энзимологии рассматривает регуляцию ферментативной активности через воздействие на активный сайт. Наиболее эффективным способом считается введение нековалентого ингибитора, блокирующего активный центр и препятствующее связыванию фермента с молекулой субстрата. Такой принцип действия имеют препараты, применяющиеся сегодня в клинической практике для лечения различных заболеваний от болезни Альцгеймера до вируса иммунодефицита человека. Описание нековалетного связывания в

активном сайте основано на методах молекулярной механики (**ММ**) и молекулярной динамики (**МД**) и заключается в основном в расчёте сродства предполагаемого ингибитора к активному центру. В системе ацетилхолинэстеразы методы МД были применены для расчёта изменения энергии Гиббса процесса связывания с нековалентным ингибитором, являющимся перспективным препаратом терапии болезни Альцгеймера [4-8]. Описание нехимических стадий каталитического цикла ферментативных реакции также может быть осуществлено динамическими методами ММ, так как образование белок-субстратного комплекса и выход продуктов в раствор не предполагают стадий разрыва и образования химических связей. В данной работе методы МД были использованы для расчёта профилей свободной энергии образования комплекса hAsp с нативным субстратом N-ацетил-L-аспартатом (**NAA**) и выхода продуктов ферментативного гидролиза в раствор [9].

Принципиально другим способом изменения каталитических свойств является аллостерическая регуляция. Лекарственные препараты, воздействующие на белок по принципу аллостерической регуляций, имеют ряд преимуществ перед нековалентными ингибиторами. Аллостерические регуляторы воздействуют на отдалённые от активного центра области фермента. Созданное на периферии возмущение структуры по многочисленным путям передаётся к активному сайту и воздействует на каталитическую функцию. Аллостерические сайты обычно менее консервативны, чем активные, что делает их более селективными мишенями. Условия их активации могут также предполагать соблюдение дополнительных ограничений на параметры окружающей среды, что делает возможным разработку лекарств, активных только в выбранных тканях и не активных в остальном организме.

Для компьютерного моделирования аллостерической регуляции необходимы как расчеты на основе молекулярной механики, так и более трудоёмкие расчеты в рамках современных подходов молекулярной

динамики. Одним из наиболее перспективных способов статистической обработки данных МД является метод динамического сетевого анализа, основанный на теории графов. Такая модель позволяет выявить наиболее заселённые пути передачи биологического сигнала между функционально значимыми областями белковой макромолекулы. По изменению основных путей передачи информации, а также по увеличению или уменьшению их протяжённости и заселённости можно выявить механизм влияния любого возмущения белковой структуры на её каталитические свойства.

До недавнего времени основной концепцией дизайна лекарственных препаратов был принцип соответствия геометрии сайта связывания структуре молекулы лиганда. Однако опубликованные в последнее время результаты поиска аллостерических сайтов с использованием методов рентгеноструктурного анализа, ядерного магнитного резонанса и мутагенеза подтвердили существование аллостерических сайтов, не удовлетворяющих начальным концепциям. Новейшие подходы к описанию явления аллостерии базируются на предположении, что регуляция осуществляется не вследствие перехода между двумя дискретными состояниями, а в результате перераспределения в конформационных ансамблях многих состояний. Такое определение процесса предполагает зависимость механизмов этих переходов от их кинетических параметров. Модель состояний Маркова позволяет на основе набора коротких молекулярно-динамических траекторий построить кинетическую модель и оценить времена самых медленных переходов системы. Работы [9, 10] посвящены применению этих подходов к моделированию регуляции ферментов на примере аспартоацилазы человека hAsp. В данной ферментативной системе возможно наличие эффекта самоактивации и самоингибирования фермента его нативным субстратом N-ацетил–L-аспартатом. Вид кривой зависимости каталитической активности от концентрации субстрата подразумевает наличие как минимум двух побочных сайтов связывания субстрата на поверхности белка, что свидетельствует о

возможном присутствии эффекта аллостерии в системе hAsp. В работах [9, 10, 11] для hAsp методами молекулярного моделирования были описаны все участки концентрационной зависимости: связывание в активационном сайте, образование белок-субстратного комплекса и последующее химическое превращение NAA, а также связывание в сайте ингибирования.

Важно, отметить, что результаты моделирования всех рассмотренных в диссертации ферментативных систем человека имеют практическое значение [7].

Поскольку для изучения аспартоацилазы применялся весь арсенал методов молекулярного моделирования механизмов регуляции активности ферментов, дальнейшее подробное изложение результатов работ по теме диссертации ограничивается только этим ферментом.

Цель работы - с использованием методов компьютерной химии исследовать механизмы регуляции ферментов на примере важнейших ферментов человека. В качестве основного объекта рассматривался фермент центральной нервной системы – аспартоацилаза (hAsp). В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Моделирование химической стадии ферментативной реакции.
2. Описание нехимических стадий ферментативных процессов: образование белок-субстратных комплексов и выход продуктов в раствор.
3. Поиск аллостерических сайтов на поверхности фермента, связывание субстрата в которых приводит к изменению каталитической активности.
4. Анализ динамических свойств димерного белка hAsp, влияющих на каталитическую функцию фермента.
5. Использование результатов молекулярного моделирования для построения кинетической схемы гидролиза субстрата N-ацетил-L-аспартата ферментом hAsp.

Научная новизна результатов:

1. Рассчитан профиль полной свободной энергии каталитического цикла hAsp и выделены стадии, вносящие наибольший вклад в каталитическую константу Михаэлиса.
2. Установлено, что в процессе динамики происходит понижение симметрии димера белка hAsp по сравнению со структурой кристалла вследствие смещения одной субъединицы относительно другой.
3. Локализован сайт аллостерического ингибирования, связывание в котором способствует стабилизации закрытой для субстрата формы hAsp.
4. Локализован сайт активации, обладающий большим сродством к субстрату, чем активный центр.
5. Рассчитана кинетическая схема конформационных переходов в димере hAsp. Самый медленный переход соответствует переходу из закрытой для субстрата конформации димерного белка в открытую.
6. На основе полученных в работе данных была предложена кинетическая схема каталитического гидролиза N-ацетил-L-аспартата. Рассчитанная кинетическая кривая находится в полном согласии с экспериментальными данными.
7. Результаты, полученные для других ферментов человека - ацетилхолинэстеразы, Arl3·RP2 и Ras·GAP, демонстрируют применимость использованных методов компьютерного моделирования свойств ферментов.

Личный вклад диссертанта заключается в сборе и анализе литературных данных, постановке задач на каждом этапе исследования, разработке или выборе методов их решения, проведении вычислений методами квантовой химии, комбинированными методами квантовой механики и молекулярной механики, методом классической молекулярной динамики, интерпретации результатов, подготовке публикаций и докладов по теме диссертационной работы.

Научная и практическая значимость данной работы заключается в детализации механизмов каталитических процессов и способов их регуляции для изученных ферментов. Результаты этой работы могут быть применены как для создания лекарственных препаратов, воздействующих на одну из изученных систем, так и для выбора методики изучения способов регуляции ферментативной активности.

Апробация работы и публикации. Материалы диссертации были представлены на международных конференциях «Ломоносов» (Москва 2015), XV и XVII ежегодной молодежной конференции с между народным участием ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (Москва 2015, 2017), международной конференции «Biocatalysis» (Москва 2015, 2017), международной конференции «12th International Meeting of Cholinesterases – 6th-Paraoxonase Conference» (Элч, 2015), международном симпозиуме «Evidence-Based Medicine: Achievements and Barriers» (Казань 2015), всероссийской конференции «Физико-химия наноструктурированных катализаторов» (Звенигород, 2016), XXXIV всероссийской школе-симпозиуме молодых ученых по химической кинетике (Московская область 2016), IX международном конгрессе «Биотехнологии: состояние и перспективы развития» (Москва 2017).

Результаты опубликованы в 17 печатных изданиях, в том числе в 8 статьях в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, в 2 статьях в изданиях, рекомендованных ВАК, и в 7 тезисах докладов на международных и всероссийских конференциях.

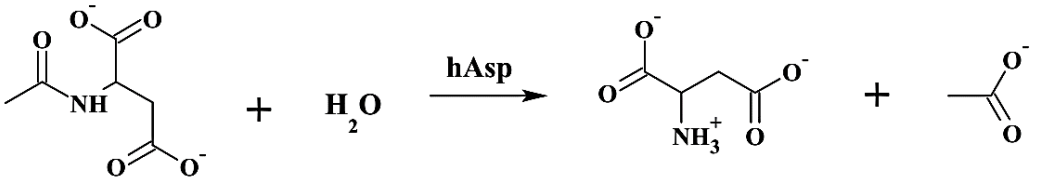
Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, 7 глав, выводов и списка цитируемой литературы из 150 наименований. Работа изложена на 109 страницах машинописного текста и включает 53 рисунка и 8 таблиц**.**

Глава 1. Аспартоацилаза (hAsp)– фермент центральной нервной системы человека

Аспартоацилаза – фермент класса гидролаз, участвующий в метаболизме N-ацетил-L-аспарагиновой кислоты (**NAA**). Поддержание уровня концентрации NAA играет существенную роль в сохранении целостности белого вещества головного мозга.

Физиологическая функция

NAA синтезируется в нейронных митохондриях из L-аспартата и ацетилкофермента А [12], а затем переносится спинномозговой жидкостью в олигодендроциты, где содержится фермент аспартоацилаза [13]. Аспартоацилаза катализирует реакцию разрыва пептидной связи NAA с образованием L-аспартат и ацетат анионов:



***N*-ацетил-*L*-аспартат** ***L*-аспартат** **Ацетат анион**

N-ацетил-L-аспартат является самым распространённым метаболитом головного мозга после глутаминовой кислоты [14, 15] и присутствует во всех тканях центральной нервной системы, достигая наибольшей концентрации в сером веществе [16]. В период постнатального развития NAA содержится как в нейронах, так и в олигодендроцитах, но локализуется в последних в зрелости и достигает концентрации 10-14 мМ [17]. Точная роль NAA в головном мозге остаётся предметом биологических и медицинских исследований [18, 19], однако основные направления его метаболизма описаны в литературе. Так, NAA является прекурсором в синтезе дипептида N-ацетиласпартилглутамата (NAAG), участвующего в нейромодуляции НМДА- и метаботропных рецепторов [20], осуществляет регуляцию внутриклеточного давления в

нейронах [21] и участвует в получении энергии из глутамат анионов в нейронных митохондриях [22]. Установлено также, что NAA является источником ацетильных групп для построения миелиновой оболочки головного мозга, поэтому сохранение уровня его концентрации обеспечивает правильное развитие и поддержание функций белого вещества [23, 24].

Благодаря характерному химическому сдвигу в ЯМР-спектрах, NAA применяется в медицинской практике в качестве маркера для *in vivo* идентификации нейронной активности. Так, было установлено, что многим нейродегенеративным заболеваниям, например, рассеянному склерозу, эпилепсии и болезни Альцгеймера, сопутствует пониженное содержание NAA в белом веществе [25, 26, 27]. В то же время, повышенная концентрация NAA является следствием развития летальной аутосомно-рецессивной лейкодистрофии – болезни Канаван – характеризующейся мутацией в гене, кодирующем hAsp [28]. 70 различных точечных мутацией гена, миссенс-мутаций и делеций, приводят к понижению ферментативной активности hAsp [29]. Большинство клинических мутаций hAsp локализованы в областях белка, удалённых от активного центра, поэтому для создания новых лекарственных препаратов наряду с изучением механизма каталитической реакции необходимо установить способы регуляции ферментативной активности.

Структурные данные

В банке данных PDB (Protein Data Bank) [30] представлено восемь кристаллографических структур гомодимера аспартоацилазы человека, четыре из которых принадлежат нативной форме: три структуры описывают геометрию апо-hAsp (PDB ID 2O53 [31], 2I3C [32] и 2Q51 [33] – ансамбль из 16 моделей), а четвёртая - принадлежит hAsp с аналогом тетраэдрического интермедиата в активном центре - PDB ID 2O4H [31]. Однако структуры свободного фермента формально могут не соответствовать апо-форме hAsp, так как их активные сайты заняты молекулами фосфат-анионов, занимающих место четвёртого лиганда катиона цинка. Их расположение в активном сайте

во многом соответствует положению аналога интермедиата, следовательно, существует вероятность, что сопутствующие связыванию преобразования структуры фермента уже произошли.

По данным эксклюзионной хроматографии и масс-спектрометрии hAsp существует в растворе в виде гомодимера (36 кДа) [34, 35], в кристаллической форме имеющего симметрию типа $P4_22_12$ (D^6_4) [32]. Поверхность hAsp, заключённая между двумя субъединицами (ASPA и ASPB соответственно), имеет доступную для связывания площадь в 1200 $Å^2$. Четвертичная структура поддерживается 12 водородными связями и 2 солевыми мостиками, расположенными симметрично относительно центра полости. Доступ в транспортные каналы двух субъединиц hAsp осуществляется со стороны поверхности раздела, что может создавать дополнительные стерические препятствия для связывания субстрата.

Общие данные о структуре

Аспартоацилаза принадлежит к семейству цинк-зависимых карбоксипептидаз [34] и состоит из двух доменов: N-домена, включающего аминокислотные остатки 1 – 212, и C-домена, состоящего из остатков 213 – 313 (рис. 1). Вторичная структура N-домена hAsp принадлежит к типу αβα-сэндвича (по классификации CATH) [36] и соответствует структуре цинк-зависимых гидролаз семейства карбоксипептидаз А (**CPA**). Нековалентные взаимодействия, обеспечивающие третичную структуру hAsp, в основном расположены между теми же элементами вторичной структуры, что в карбоксипептидазе А [37].

Отличие третичной структуры hAsp от карбоксипептидаз заключается в отсутствии у последних C-домена: активный сайт карбоксипептидаз расположен на поверхности белка, поэтому оказывается доступен большим пептидным субстратам. В hAsp C-домен, состоящий из двух β-листов и неструктурированных участков, стерически закрывает доступ к

каталитическому центру. Соединяясь, C- и N-домены образуют глубокий и узкий транспортный канал, ведущий к активному сайту. Участки белковой цепи, образующие ворота в транспортный канал, состоят в основном из положительно заряженных аминокислотных остатков: Arg71, Lys228, Lys291 и Lys292, что может способствовать связыванию органических молекул, несущих отрицательный заряд.

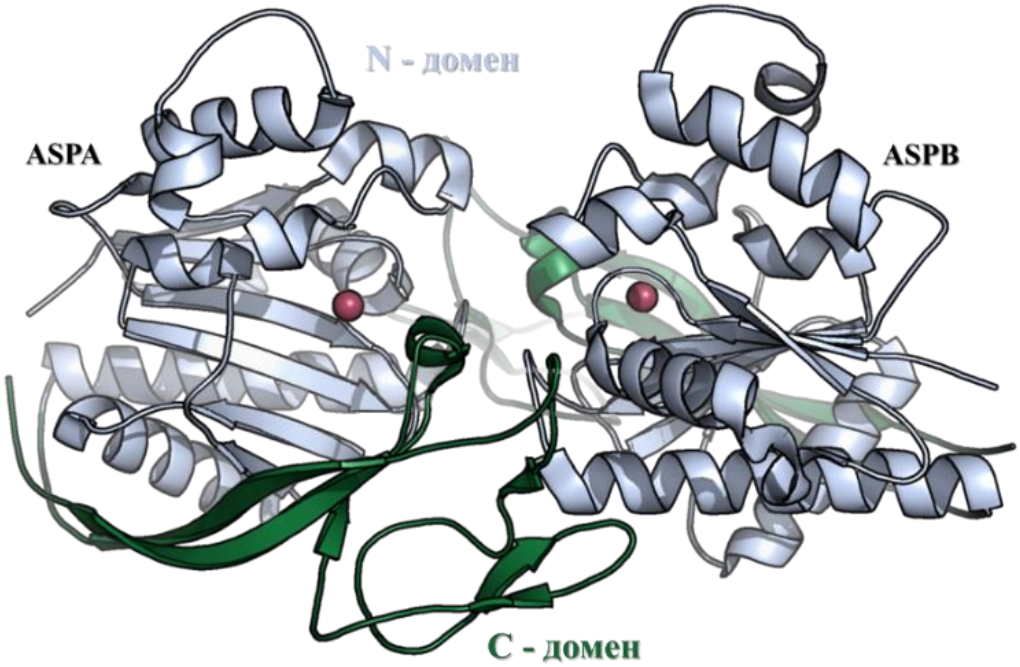


Рисунок 1. Две субъединицы hAsp - ASPA и ASPB. Расположение C и N доменов.

Ворота в транспортный канал hAsp сформированы петлями 62-74 с одной стороны и 282-294 – с другой. В кристаллических структурах апо-hAsp расстояния между центрами масс основной цепи этих петель колеблется между 15,7 Å и 16,6 Å. Сравнение расположения аминокислотных остатков, формирующих вход в активный сайт, позволяет предположить высокую подвижность этого участка белковой цепи (рис. 2). В 16 моделях структуры PDBID 2Q51 подвижности петель 62-74 и 282-294 практически идентичны в двух субъединицах hAsp (ASPA и ASPB соответственно). Наиболее лабильные аминокислоты – Arg71 и Glu293 – принимают как открытую конформацию, так и закрытую. Пониженное значение электронной плотности в области расположения боковой цепи Arg71 одного из мономеров 2O53 также

свидетельствует о высокой степени подвижности этого участка в апо-hAsp и о возможности его ориентации как внутрь транспортного канала, так и наружу в раствор.

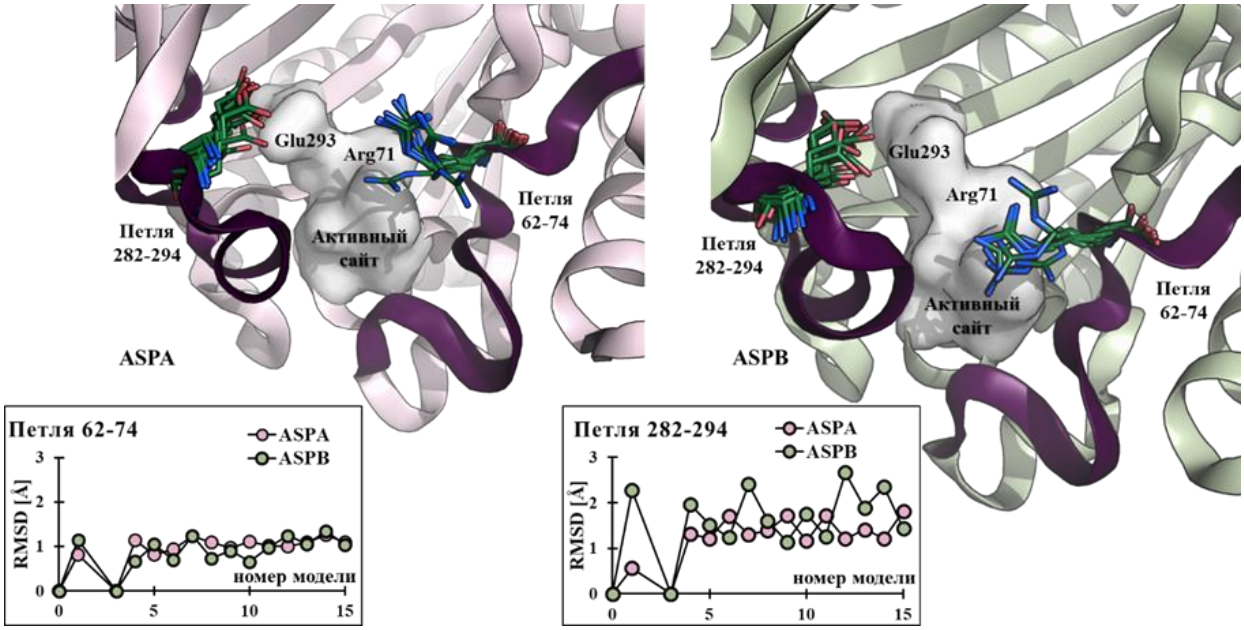


Рисунок 2. Положение аминокислот, образующих ворота в транспортный канал hAsp, в кристаллографической структуре PDB ID 2Q51.

При связывании аналога тетраэдрического интермедиата N-фосфонометил-L-аспартата (**NPA**) в активном сайте hAsp меняется положение боковых цепей некоторых остатков ворот транспортного канала. Так, смещаясь на 4 – 5 Å относительно положения в апо-форме, Arg71 образует прочные электростатические взаимодействия с карбоксильной группой субстрата и участвует в его связывании в активном сайте. Ароматическая группа Tyr164 смещается на 45°относительно Cα – Cβ связи для образования водородной связи между гидроксилом тирозина и карбоксильным кислородом NAA.

Наложение кристаллографических структур hAsp 2I3C и 2O53 с фосфат-анионом в координационной сфере цинка показало, что наибольший вклад в среднеквадратичное отклонение между ними вносит участок 158 – 164 ($RMSD_{max}$ = 7.1 Å) [31]. Авторы объясняют такое расхождение различиями в концентрациях фосфат анионов в процессе кристаллизации. Однако стоит отметить, что петля 158 – 164 расположена над входом в каталитический центр

hAsp, и следовательно, может принимать участие в регуляции связывания субстрата [32].

Структура активного сайта

Активный сайт аспартоацилазы расположен на дне узкого транспортного канала на расстоянии ~ 12 Å от поверхности фермента и состоит из трёх областей, различающихся своими функциями:

- область координации катиона Zn^{2+}: His21, Glu24 и His116;
- область связывания NAA: Arg63, Asn70, Arg71, Tyr164, Arg168 и Tyr288;
- каталитическое основание Glu178 – акцептор протона, отщепляющегося после нуклеофильной атаки воды на карбонильный углерод NAA.

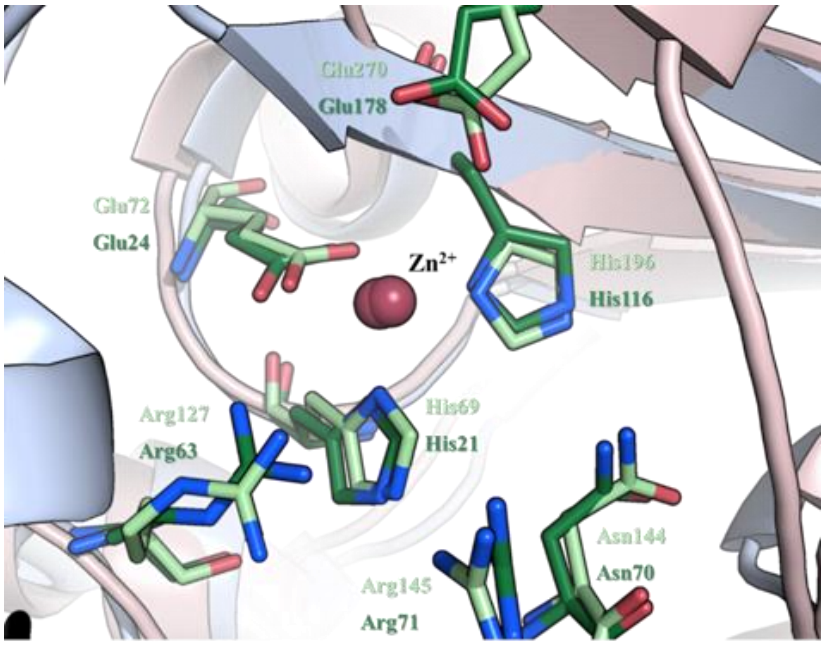


Рисунок 3. Наложение активного сайта карбоксипептидазы А (светло-зелёный углерод, голубая вторичная структура) и hAsp (зелёный углерод, светло-розовая вторичная структура).

Состав и расположение аминокислотных остатков активного центра hAsp и карбоксипептидазы А (PDB ID 1M4L) практически идентичны (рис. 3). Их среднеквадратичное отклонение составляет 0,7 Å, что характерно для различных кристаллографических структур одного белка. Можно

предположить, что каталитический механизм гидролиза NAA аналогичен CPA: на первом этапе образуется тетраэдрический интермедиат в результате нуклеофильной атаки воды, а на втором происходит разрыв пептидной связи и образование уксусной и аспарагиновой кислот.

Все кристаллографические структуры hAsp в банке данных содержат один катион цинка в активном сайте. Координационная сфера Zn^{2+} состоит из трёх консервативных аминокислотных остатков: His21, Glu24 и His116 (рис. 4).

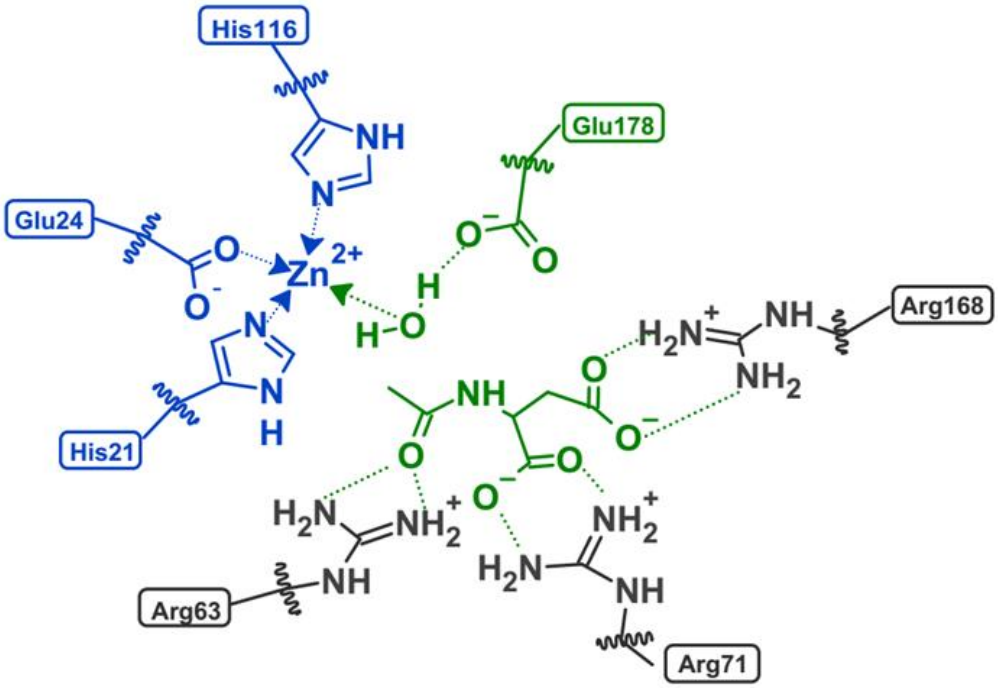


Рисунок 4. Схема активного сайта. Синим цветом выделены постоянные лиганды катиона цинка, зелёным – Glu178, NAA и молекула воды, непосредственно участвующие в каталитическом гидролизе.

Последовательная замена каждой из этих аминокислот на аланин приводит к полному исчезновению активности [38], как и парные замены H21E/E24H и E24H/H116E [39]. Природа четвёртого лиганда цинка по-видимому зависит от строения активного центра: в структурах псевдо апо-формы hAsp один из кислородов фосфатной группы входит в координационную сферу, а в системе с аналогом тетраэдрического интермедиата его место занимает кислород фосфоновой группы. Можно предположить, что в отсутствии лигандов в координационную сферу цинка может входить вода.

Зависимость каталитической функции hAsp от присутствия иона цинка была подтверждена кинетическим экспериментом. Воздействие хелатирующего агента о-фенантролина (**OP**) приводит к существенному понижению каталитической активности hAsp (14%), а медленное добавление разбавленного раствора $ZnCl_2$ к диализированному от OP hAsp способствует восстановлению активности, причём избыток ионов металла также ингибирует ферментативный гидролиз [34]. По результатам масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой, содержание ионов цинка и активных центров соотносится как 1:1 [34].

Наличие кристаллографической структуры hAsp с аналогом тетраэдрического интермедиата (PDB ID 2O4H) позволяет описать взаимодействия в активном сайте, ответственные за связывание субстрата и стабилизацию интермедиатов гидролиза NAA (рис. 5). Карбоксильные группы NPA ориентированы электростатическими взаимодействиями с Arg71 и Arg168 и водородными связями с Asn70, Tyr164 и Tyr288.

Тетраэдрическая фосфонильная группа координирована катионом цинка и боковой цепью Arg63. Расстояние между азотами гуанидиновой группы аргинина и атомом фосфора составляет ~ 4,5 Å, поэтому существует вероятность, что Arg63 участвует только в стабилизации интермедиатов, но не вносит существенного вклада в образование устойчивого белок-субстратного комплекса.

Вклад Arg71 в стабилизацию последующих интермедиатов гидролиза может быть проиллюстрирован результатами направленного мутагенеза. Консервативная замена R71K приводит к понижению k_{cat} в 20 раз, в то время как значение K_m остаётся практически неизменным [31]. Направленная замена R71N ведёт к полному исчезновению каталитической активности [39].

Замена Y164F понижает значение k_{cat} на 2,5 порядка, а значение K_m увеличивается в 6 раз по сравнению с диким типом hAsp, свидетельствуя о понижении сродства субстрата к активному центру [31].

Точечные консервативные мутации R168K и Y288F понижают значение k_{cat} на один порядок [31]. Гидроксильный кислород Tyr288 расположен на расстоянии 2,7 Å от карбоксильного кислорода субстрата и на расстоянии 2,8 Å от азота аминогруппы. Так, образуются две водородные связи, стабилизирующие интермедиат на стадии разрыва пептидной связи.

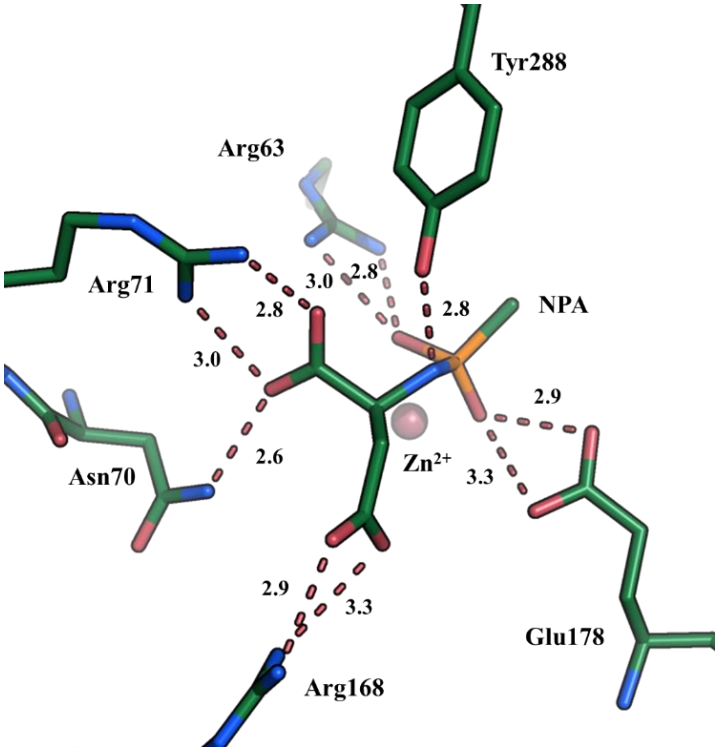


Рисунок 5. Геометрия активного сайта hAsp PDB ID 2O4H.

Glu178 действует как общее основание, принимая протон от каталитической молекулы воды на первой стадии гидролиза [39, 40, 41]. В всех кристаллографических структурах псевдо-апо-hAsp Glu178 находится на расстоянии образования водородной связи от кислорода фосфатной группы в координационной сфере цинка – аналогично он расположен в комплексе с NPA. В белок-субстратном комплексе Glu178 может способствовать поляризации каталитической молекулы воды. Активированный гидроксил атакует карбонильный углерод, поляризованный цинком и Arg63, и образуется

тетраэдрический интермедиат. Последующий перенос двух протонов на азот NAA может осуществляться как Glu178, так и Tyr288 [42]. Точечный направленный мутагенез E178Q приводит к полной потере каталитической активности hAsp, а замена на аспарагиновую кислоту способствует понижению k_{cat} на 1 порядок при фактически неизменном значении K_m, что свидетельствует о бо̀льшем вкладе Glu178 в стабилизацию переходных состояний, чем в связывание субстрата в активном сайте hAsp [42].

Молекулярный полиморфизм hAsp

Молекулярный полиморфизм hAsp включает набор клинических миссенс-мутаций, являющихся причиной болезни Канаван. Как было отмечено выше, на сегодняшний день известно о существовании 70 замен, приводящих к частичной или полной потери каталитической активности hAsp. Для мутаций E285A, F295S, Y231C и K213E были получены кристаллографические структуры с NPA в активном сайте [43] (PDB ID 4MXU, 4NFR, 4MRI, 4TNU). Положение этих мутаций не предполагает их прямого участия в ходе каталитического гидролиза, однако наличие каждой из них является причиной болезни Канаван разной степени тяжести [44, 45]. В организме мутации K213E, как правило, сопутствует замена G274R [44]. Долгое время считалось, что при двойной мутации K213E/G274R, K213E способствует увеличению активности мутантного hAsp. Однако в серии экспериментов, сочетавших точечный мутагенез и измерение специфической активности, было показано, что hAsp (K213E) действительно, обладает активностью нативной hAsp, однако каталитические свойства hAsp(G274R) и hAsp(G274R/K213E) не отличались между собой.

В данной работе система hAsp (K213E) (PDB ID 4MXU) была использована для верификации предлагаемого механизма регуляции каталитической активности.

Механизм каталитического гидролиза

Первые предположения о механизме ферментативного гидролиза NAA были основаны на сходстве активного сайта hAsp и карбоксипептидазы A [32].

Механизм ферментативного гидролиза NAA был описан компьютерными методами в приближении теории функционала плотности (DFT/B3LYP//6-31G(d)) [46]. Модель состояла из 109 атомов активного сайта, включая катион цинка, его координационную сферу, молекулу субстрата и аминокислотные остатки Arg63, Asn70, Arg71, Arg168 и каталитический Glu178, при этом остатки аргинина, глутамина, гистидина и аспарагины были аппроксимированы метилгуанидином, ацетатом, 4-метилимидазолом и ацетамидом соответственно. Влияние окружения было описано моделью континуального растворителя в неявном виде с диэлектрической проницаемостью ε = 80 для воды и ε = 5 для белка.

По результатам моделирования было получено шесть стационарных точек (рис. 6) на поверхности потенциальной энергии, соответствующих комплексам белок-субстрат (ES) и белок-продукты (EP), двум интермедиатам (INT1, INT2) и двум седловым точкам (TS1, TS3). Седловая точка между интермедиатами локализована не была.

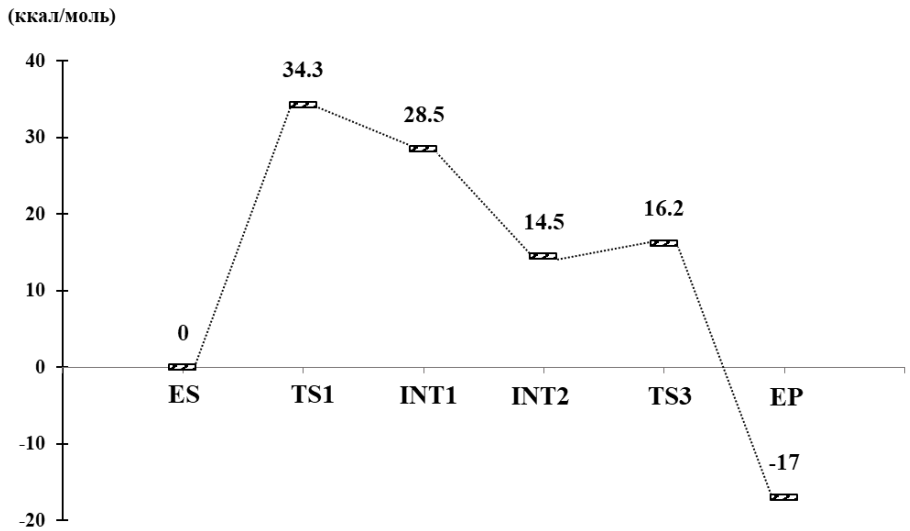


Рисунок 6. Результаты расчёта потенциальной энергии стационарных точек в работе [46].

В комплексе ES кислород каталитической воды находится на расстоянии 3.67 Å от карбонильного углерода NAA, а ближайший к Glu178 протон образует с карбоксильным кислородом связь (1,02 Å). На первом шаге происходит нуклеофильная атака воды (TS1, ΔE = 34,3 ккал/моль). Образующийся тетраэдрический интермедиат (INT1, ΔE = 28,5 ккал/моль) стабилизируется за счёт взаимодействия с Zn^{2+} и Arg63. Переход ко второму интермедиату (INT2, ΔE = 14,5 ккал/моль) происходит в результате вращения вокруг связи Cγ-Cδ Glu178. Понижение энергии на 14 ккал/моль происходит за счёт образования дополнительных водородных связей между Glu178 и NAA. На последнем шаге происходит передача протона с Glu178 на азот NAA (TS3, ΔE = 16,2 ккал/моль) и разрыв пептидной связи (EP, ΔE = -17,0 ккал/моль). В комплекс hAsp с продуктами гидролиза входят аспарагиновая кислота с нейтральной аминогруппой, уксусная кислота и протонированный Glu178. Таким образом, предлагаемый механизм гидролиза не включает стадию регенерации фермента. Скорость-определяющей была выбрана первая стадия гидролиза – нуклеофильная атака. Для первой и последней стадий был рассчитан путь минимальной энергии гибридным методом КМ/ММ в приближении сильной связи (SCC-DFTB) для квантовой части и потенциалами силового поля CHARMM [47] для молекулярно-механической [48]. Высота барьера стадии нуклеофильной атаки составила (ΔE = 24 ккал/моль). Однако в результате пересчёта потенциала средней силы методом зонтичной выборки [49] и обработки результатов методом анализа взвешенных гистограмм (WHAM) [50], величина барьера была понижена до 16 ккал/моль.

Несмотря на то, что по теории активированного комплекса (ТАК) энергия лимитирующей стадии в [48] согласуется с энергией активации, соответствующей константе скорости 12 $с^{-1}$ [34], описание механизма гидролиза не может считаться полным, во-первых, ввиду отсутствия стадий регенерации фермента, а во-вторых, ввиду ограниченности приближения SCC-

DFTB в описании систем передачи протона [51]. К тому же стоит отметить ограниченную применимость ТАК к многоатомным молекулам.

Каталитическая активность hAsp

Наряду с важной биологической функцией, выполняемой hAsp, научный интерес описания её каталитических свойств обусловлен и редкими кинетическими параметрами – большим спектром способов регуляции ферментативной активности, включающим аллостерическую самоактивацию и самоингибирование [34].

Кинетические измерения для аспартоацилазы проводились в присутствии 1000-кратного избытка субстрата по схеме Михаэлиса-Ментен. Значение параметра k_{cat} для рекомбинантной hAsp зависит от метода детектирования концентрации продукта реакции. Значение k_{cat} = 12,7 ± 0,05 было получено методом УФ-спектрофотометрии по концентрации фумарата, синтезированного из L-аспартата [34]. При определении концентрации продукта методом спектрофотометрии L-аспартат подкрашивался в розовый цвет в результате воздействия тринитро-бензил-сульфоновой кислоты. k_{cat} рекомбинантной hAsp составила 14,22 ± 0,48 c^{-1} [42].

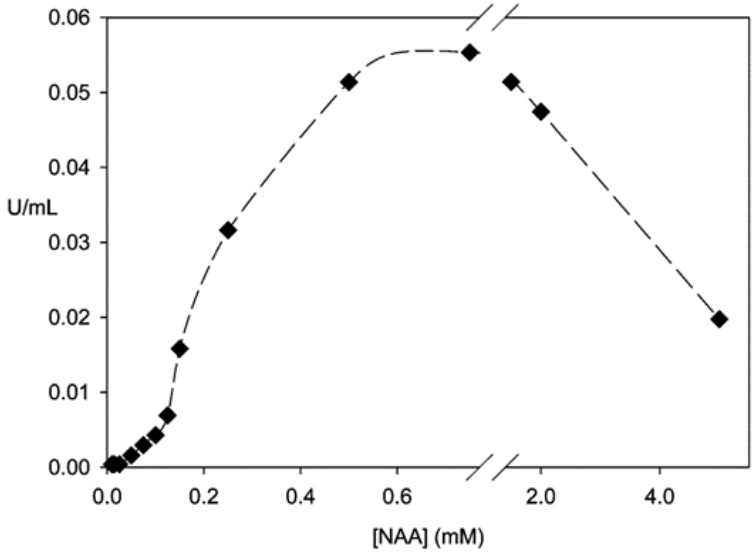


Рисунок 7. Кинетическая кривая зависимости активности фермента hAsp (ед. активности/мл) от концентрации субстрата NAA (мМ) [34].

Исследование зависимости активности hAsp от концентрации субстрата показало, что при малых концентрациях (<0,3 мМ) кривая имеет s-образную форму, что может свидетельствовать о наличие эффекта самоактивации [34]. Однако при высоких концентрациях (>1 мМ NAA) активность фермента падает, указывая на возможность существования дополнительного сайта связывания NAA, регулирующего ингибирование hAsp (рис. 7).

В данной работе гибридным методом квантовой механики и молекулярной механики КМ (DFT/PBE0 [52, 53]//6-31G(*)) / ММ (Amber99 [54]) был рассчитан профиль потенциальной энергии химической стадии каталитического гидролиза NAA (**глава 2**) [1]. На основе рассчитанных стационарных точек был получен профиль свободной энергии Гиббса полного каталитического цикла hAsp. Стадии образования белок-субстратного комплекса и выхода продуктов в раствор были описаны в подходе классической молекулярной динамики (**МД**) с применением углублённых методов изучения поверхности свободной энергии. Полученные результаты позволили выделить скорость-лимитирующие стадии ферментативной реакции (**глава 3**) [1, 11]. В рамках создания корректной модели для дальнейшего исследования hAsp, была описана зависимость динамики и каталитической функции белка от его четвертичной структуры (**глава 4**) [9]. Основываясь на выводах кинетического эксперимента [34], был проведён поиск аллостерических сайтов на поверхности димера hAsp. Исследование поверхности белка и оценка сродства обнаруженных сайтов привели к обнаружению возможных сайтов самоингибирования и самоактивации hAsp. Результаты тщательной обработки МД траекторий обнаруженных сайтов позволили выдвинуть предположение о механизме аллостерической регуляции hAsp (**глава 5** и **глава 6**) [9, 10]. Полученные в ходе работы результаты были использованы для создания кинетической схемы для системы hAsp - NAA (**глава 7**) [10]. Расчётная кривая зависимости активности от концентрации NAA согласуется с экспериментальными данными.

Глава 2. Расчёт профиля поверхности потенциальной энергии для ферментативного гидролиза NAA

Описание химической стадии ферментативного гидролиза NAA в активном центре NAA подразумевает поиск пути минимальной энергии на поверхности потенциальной энергии системы и описание всех стационарных точек от белок-субстратного комплекса ES до комплекса hAsp с продуктами EP_1P_2.

Методы поиска стационарных состояний на поверхности потенциальной энергии ферментативной реакции

Одно из самых популярных описаний многоатомных биологических систем в атомарном разрешении в современной компьютерной химии осуществляется методами молекулярной механики (**ММ**). Ввиду высокого качества параметризации белковых силовых полей (CHARMM, Amber и пр.) в динамическом подходе данный метод позволяет получить развёрнутое описание системы на промежутках времени до 1 миллисекунды. Однако при всех своих преимуществах, ММ подход не способен описать процессы разрыва и образования ковалентных связей, что делает его неприменимым для изучения механизмов каталитических реакций. Принято считать, что при протекании химической реакции существенное перераспределение электронной плотности происходит лишь в небольшой части структуры фермента, ограниченной аминокислотами активного центра и субстратом. Оставшаяся часть белковой молекулы вносит существенный вклад в поддержание третичной структуры и взаимодействия с окружающей средой и остаётся практически неизменной за время протекания реакции.

Наиболее оптимальный подход к поиску стационарных точек ферментативной реакции – разделить систему на две части: квантовую (**КМ**) подсистему, ограниченную активным сайтом, и ММ подсистему, содержащую остальную часть белка и оболочку из молекул воды [55-58]. Тогда полный гамильтониан системы можно записать следующим образом:

$$H_{total} = H_{QM} + H_{MM} + H_{QM/MM},$$

где H_{QM} и H_{MM} включает энергию взаимодействия всех атомов изолированных КМ и ММ подсистем соответственно. Способы их расчёта будут описаны отдельно. Наибольшую трудность представляет расчёт члена $H_{QM/MM}$, включающего энергетический вклад от всех парных взаимодействий атомов КМ и ММ частей.

В простейшем случае применяется метод механического внедрения (**ММВ**), когда электростатические и ван-дер-ваальсовы вклады между КМ и ММ задаются исключительно частичными зарядами силового поля [59]. Ковалентные связи и валентные углы между подсистемами описываются гармоническими потенциалами, а торсионные взаимодействия – периодическим потенциалом. Применение метода механического внедрения позволяет провести быстрый и достаточно эффективный расчёт стационарных точек химического превращения в многоатомной системе, однако он обладает набором недостатков, сужающих границы его применимости. Метод подразумевает расчёт электронной волновой функции для изолированной КМ подсистемы, без учёта поляризации, вносимой ММ частью. Однако, уникальные свойства ферментативных катализаторов обусловлены нековалентными взаимодействиями субстрата с белковым окружением. Пренебрежение поляризацией КМ части может привести к дестабилизации переходных состояний и интермедиатов химической реакции. К тому же, в ходе химической реакции происходит существенное перераспределение электронной плотности в активном сайте фермента. Однако обновление частичных зарядов КМ части в ходе расчёта нежелательно, так как может привести к нарушению непрерывности рассчитываемого профиля поверхности потенциальной энергии.

Основные недостатки ММВ устранены в методе электронного внедрения (**МЭВ**), учитывающем поляризацию КМ части белковым окружением. В МЭВ

частичные заряды ММ входят в одноэлектронный оператор гамильтониана КМ (в атомных единицах):

$$\widehat{H}_{QM/MM}^{эл} = -\sum_{I}^{N}\sum_{J}^{L}\frac{q_J}{|r_i - R_J|} + \sum_{\alpha}^{M}\sum_{J}^{L}\frac{q_J Q_\alpha}{|R_\alpha - R_J|},$$

где q_J – точеные заряды ММ части, находящиеся на расстоянии R_J; Q_α – заряды ядер КМ атомов, расположенных на R_α; r_i описывает положение электронов [60]. Соответственно, индексы i, J, и α проходят все значения по N электронам, L точечным зарядам и M КМ ядрам системы. При таком подходе электронная структура КМ рассчитывается при фиксированных частичных зарядах ММ на каждом шаге. [61].

Учёт поляризации КМ через значения точечных зарядов стандартного силового поля не является абсолютно корректным. При параметризации силового поля значения частичных зарядов подбираются так, чтобы в совокупности с остальными параметрами наиболее корректно описывать физические процессы и рассчитывать экспериментальные величины с наибольшей точностью. Значения точечных зарядов, соответствующие реальному распределению электронной плотности, при таком подходе не используются. То же относится и к значениям параметров ван дер Ваальса. Тем не менее именно схема электронного внедрения является наиболее популярной при расчёте профилей потенциальной энергии химических реакции в биологических молекулах. Обилие корректных результатов, полученных для ферментативных систем в МЭВ с применением силовых полей CHARMM и Amber, позволяет применять МЭВ в текущей работе для расчёта профиля потенциальной энергии ферментативного гидролиза NAA.

Следующим шагом к повышению точности расчёта $H_{QM/MM}$ является создание гибкой модели зарядов ММ, способных адаптироваться к изменениям в квантовой части. Метод поляризационного внедрения (**МПВ**) может быть разделён на два подхода: в первом поляризованная ММ часть не

воздействует на КМ, а во втором создаётся самосогласованная система поляризации, где изменение зарядов ММ учитывается при расчёте H_{QM}. Для описания поляризации ММ части в настоящее время развиваются поляризуемые силовые поля на основе друдовских осцилляторов [62], переменных зарядов [63] и наведённых диполей [64]. Основным препятствием в их использовании является отсутствие достаточного объёма модельных биологических объектов, необходимых для создания более совершенного набора параметров силового поля [65]. Недостатком подхода также можно назвать значительное увеличение расчётного времени, что может вносить дополнительные ограничения на размер КМ части.

Применение метода КМ/ММ к ферментативным реакциям подразумевает включение в КМ часть аминокислот активного центра, участвующих в каталитическом превращении и в связывании субстрата. Это неизбежно приводит к необходимости включения в $H_{QM/MM}$ энергии ковалентных связей, по которым проходит граница раздела между подсистемами. Разрыв каждой связи создаёт одну пару неподелённых электронов в КМ. Восполнение не скомпенсированной валентности может быть реализовано по-разному.

Наиболее популярным способом описания разрываемой ковалентной связи является метод связующих атомов (link-atom). В КМ части вместо разорванной связи образуется новая ковалентная связь со связующим атомом. При этом энергия ММ подсистемы рассчитывается независимо. Введение дополнительных атомов, не являющихся частью системы, приводит к возникновению нескольких проблем:

- каждый связующий атом вносит три дополнительные степени свободы, несуществующие в реальной системе;
- добавленные атомы расположены в непосредственной близости от ММ атомов, которые они заменяют, что неизбежно приводит к переоценке поляризации;

- химические и электронные свойства добавленных атомов отличаются от заменяемых.

Эффект наличия лишних степеней свободы нивелируется введением ограничений на положение связующего атома. Для уменьшения вносимой связующими атомами поляризации применяется множество подходов: исключение одноэлектронных взаимодействий добавленных атомов; точечные заряды связующих атомов ММ принимают равными нулю; перенос или перераспределение точечных зарядов для добавленных атомов и др.

Чаще всего в качестве связующих атомов используются атомы водороды, однако для этих целей в общем может использоваться любая одновалентная группа. Применение атомов водорода в большей степени обусловлено простотой описания, однако также стоит отметить, что электронейтральность водорода и sp^3-гибридизованного углерода достаточно близки.

В данной работе для описания $H_{QM/MM}$ всех описываемых систем [1-3] применялся метод электронного внедрения. Электронная плотность КМ во время оптимизации ММ была аппроксимирована моделью точечных зарядов. Подход зарядов электростатического потенциала (Electrostatic Potential fitting – **ESP**) [57] позволяет проводить КМ/ММ расчёты многоатомных систем, пренебрегая стадией релаксации КМ части при оптимизации ММ.

Ковалентные связи, по которым проходила граница КМ и ММ подсистем, были аппроксимированы связующими атомами водорода. Положение добавленных атомов водорода было ограничено выражением:

$$R_{Hlink} = (1 - g)R_{QM} + g \cdot R_{MM},$$

где g – масштабирующий коэффициент = 0.709. Оптимизация КМ части и связующих атомов проходила по алгоритму Бройдена – Гольдфарба – Шанно (**BFGS**) [66], а ММ части – квази-ньютоновским методом (**LBFGS**) [67]. Все невалентные взаимодействия в системе между КМ и ММ частями были учтены (cutoff = 10 нм). Уменьшение рассчитываемой поляризации в местах обрыва

ковалентной связи описывалось исключением точечных зарядов добавленных протонов из ММ оптимизации.

Методы описания ММ системы

Молекулярно-механический подход подразумевает представление белковой макромолекулы как системы заряженных шариков, связанных пружинами разной жёсткости. Электронная энергия вычисляется с помощью параметризованной функции силового поля, которая в явном или неявном виде учитывает все виды взаимодействий в системе. Параметры силовых полей рассчитываются *ab initio* методами и оптимизируются для воспроизведения результатов эксперимента. Классическая функция потенциальной энергии включает энергию ковалентных связей, ван дер Ваальсовы взаимодействия, описываемые потенциалом Леннарда-Джонса и электростатическую энергию частичных зарядов. В общем случае общее выражение для потенциальной энергии ММ системы можно записать следующим образом:

$$E_{MM} = \sum_{\text{связи}} k_d(d - d_0)^2 + \sum_{\text{углы}} k_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{торсионы}} k_\varphi[1 + cos(n\varphi + \delta)] + \sum_{\text{невалентные связи}} \left\{ \varepsilon_{AB} \left[\left(\frac{\sigma_{AB}}{r_{AB}}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{AB}}{r_{AB}}\right)^{6} \right] + \frac{1}{4\pi\varepsilon_0} \frac{q_A q_B}{r_{AB}} \right\},$$

где d, θ и φ обозначают текущие значения длины связи и величин угла и двугранного угла, d_0 и θ_0 – соответствующие равновесные значения, а n и δ – кратность торсиона и его фаза. Силовые константы гармонических потенциалов обозначены k_d, k_θ и k_φ; r_{AB} – расстояние между несвязанными атомами A и B, ε_{AB} и σ_{AB} – параметры потенциала Леннарда-Джонса, q_A и q_B – частичные заряды, ε_0 – диэлектрическая проницаемость. Существует набор силовых полей, параметризованных для биохимических систем: белков, нуклеиновых кислот, жиров и углеводов. Иногда к ним добавляется набор малых органических молекул и свободных ионов металлов, распространённых в организме (Mg, Zn, Ca, Na, K и др.). Наиболее популярными силовыми

полями для белковых систем в последнее время стали CHARMM [47, 68], AMBER [54], GROMOS [69] и OPLS [70]. Все они также имеют общее поле органических молекул [71- 74].

В данной работе для описания ММ подсистемы в КМ/ММ расчётах были использованы силовые поля AMBER [1-3] и CHARMM [1, 4-11]; выбор между этими силовыми полями был обусловлен удобством применения алгоритмов использованного программного обеспечения.

Методы описания КМ подсистемы

Принципы реализации комбинированного КМ/ММ метода могут быть адаптированы практически к любому методу расчёта электронной энергии КМ части. Описание химических реакции в активном сайте белка ограничивает набор *ab initio* методов, ввиду того, что обычный размер ферментативной КМ системы составляет ~ 100 - 250 атомов. Наиболее подходящим по уровню точности и учитывающим энергию корреляции методов является теория функционала плотности (Density Functional Theory - **DFT**) [75]. DFT предполагает описание электронной энергии системы через электронную плотность $\rho(r)$ [76]:

$$E[\rho] = \int V_{\text{я}}(r)\rho(r)dr + \frac{1}{2}\int\int \frac{\rho(r)\rho(r')}{|r-r'|}drdr' + G[\rho].$$

$V_{\text{я}}(r)$ – ядерный потенциал, отвечающий за притяжение электронов к ядрам системы. Второе слагаемое системы имеет вид кулоновского потенциала и описывает электронное отталкивание. А последний член – функционал электронной плотности – включает кинетическую энергию системы, обменный интеграл и корреляционную поправку. Вид функционала не определён, поэтому для его расчёта применяются приближённые методы. Основной задачей параметризации функционала является описание обменно-корреляционной энергии (E_{xc}).

Приближение локальной плотности (**ПЛП**) – один из простейших способов описания E_{xc}. ПЛП основано на предположении, что электронная плотность – медленно изменяющаяся функция, поэтому E_{xc} может быть рассчитана через плотность газа свободных электронов. Однако DFT в приближении локальной плотности вносит большую ошибку в расчёт энергий связи – до 50 ккал/моль [77] – поэтому он неприменим для описания процессов в активном центре фермента.

В реальной молекулярной системе функция электронной плотность не равномерна. Поэтому развитием метода ПЛП является учёт градиента локальной плотности при расчёте E_{xc}. Использование функционалов с градиентной поправкой позволяет снизить вносимую ошибку до 6 – 7 ккал/моль [78]. Однако такой порядок ошибки всё ещё не позволяет использовать градиентные функционалы для расчёта пути ферментативных реакций, где он сопоставим с величинами барьеров элементарных стадий и изменением энтальпии всего превращения.

Приближением более высокого уровня являются гибридные методы, включающие обменный потенциал Хартри-Фока. Тогда корреляционную энергию можно записать в виде линейной комбинации:

$$E_{xc} = (1 - a)E_{xc}^{DFT} + aE_{x}^{HF},$$

где a – оптимизируемый параметр конкретного функционала, принимающий значение в интервале [0;1] [79]. Для расчёта E_{xc}^{DFT} зачастую используется энергия приближения ПЛП. E_{x}^{HF} – энергия обмена метода Хартри-Фока. Применение гибридных функционалов (B3LYP [80], PBE0 [52, 53]) позволяет снизить величину ошибки до 1,5 – 4 ккал/моль [81], что делает возможным их применение для описания ферментативных систем. Функционал PBE0 успешно применяется для КМ/ММ расчёта профилей потенциальной энергии ферментативных процессов, в частности для цинк-зависимых протеаз [82, 83].

Считается, что хорошие результаты применения метода DFT получаются при использовании трёх-экспонентных базисов [81]. Такие базисы зачастую необходимы для точного расчёта энергии, в то время как оптимизация геометрии в двух-экспонентном базисе даёт тот же результат, что и в базисах большего размера. Поэтому в данной работе был использован базис 6-31G**, успешно применяемый совместно с DFT/PBE0 для расчёта энергии и геометрии стационарных точек [83].

Молекулярная динамика с КМ/ММ потенциалами

Методы молекулярной динамики применяются для моделирования эволюции системы во времени и расчёта термодинамических величин при заданной температуре. Комбинированный подход КМ/ММ может быть применён и в МД моделировании для прямого расчёта электронной структуры активного сайта фермента и учёта влияния окружения через потенциалы силовых полей.

В работе использован метод МД Борна – Оппенгеймера в каноническом ансамбле при 300 К и 1 атм. КМ часть была описана гибридным методом функционала плотности, в котором для решения волнового уравнения используется базис гауссовых функций, а электронная плотность описывается базисом плоских волн. Такой подход позволяет значительно уменьшить время расчёта обменных кулоновских интегралов [84]. ММ часть была описана силовым полем CHARMM. Все расчёты КМ/ММ МД в работе были проведены в программном пакете CP2K [85].

Построение профиля потенциальной энергии ферментативной реакции hAsp

В качестве стартовой геометрии тяжёлых атомов была взята кристаллографическая структура с аналогом интермедиата (PDBID 2O4H). Атом фосфора в молекуле NPA был заменён на углерод, и к системе были добавлены атомы водорода в программном пакете Reduce [86].

Функциональные группы Asp, Glu, Lys и Arg были протонированы согласно значению pH = 7. При протонировании гистидинов предпочтение отдавалось форме, образующей наибольшее число водородных связей с белковым окружением. В модель системы вошло около 600 молекул окружения. Оптимизация геометрии и расчёт энергий был проведён методом КМ(DFT/PBE0/6-31G**) /MM(AMBER99) в программном пакете NwChem6.5 [87].

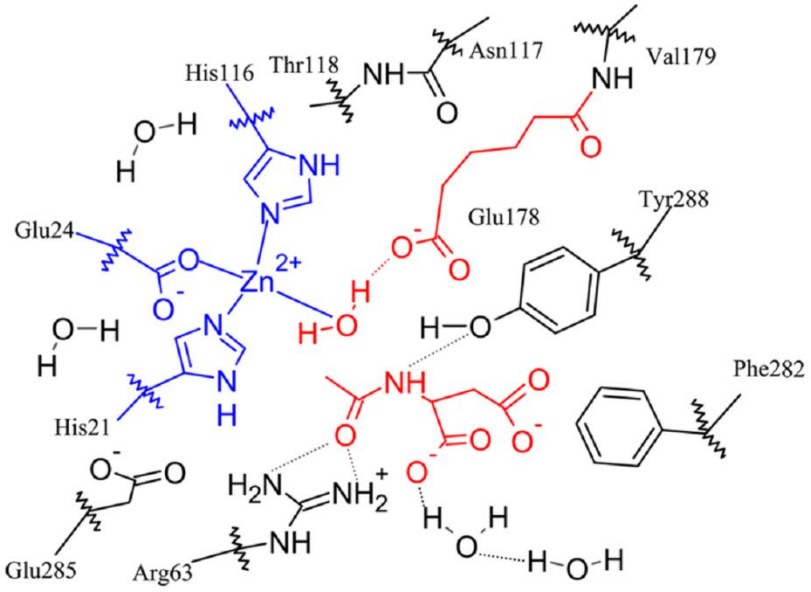


Рисунок 8. Состав квантовой части в основном расчёте стационарных точек химической стадии гидролиза.

В основном расчёте КМ часть включала 132 атома (рис. 8): His21, Glu24, Arg63, His116, Glu178, Phe282, Tyr288, основная цепь Asn117 и Thr118, катион цинка и 5 молекул воды. Для валидации основных выводов работы, геометрии ключевых стационарных точек были также оптимизированы с расширенной квантовой частью.

Начиная от первого тетраэдрического интермедиата, расчёт пути минимальной энергии проходил по двум направлениям – в сторону белок-субстратного комплекса (ES) и к продуктам реакции (EP_1P_2). Определение пути перехода между интермедиатами проводилось по предварительно выбранным координатам реакции с приложением гармонического потенциала.

Затем все стационарные точки подвергались минимизации без наложения внешних сил. Значение критерия сходимости составило $1 \cdot 10^{-6}$ а.е.э. Оценка мнимых частот переходов проводилась через предварительный расчёт гессианов вблизи седловых точек. Вслед за минимизацией переходного состояния по выбранной частоте, проводился повторный расчёт матрицы вторых производных энергии системы для вычисления точного значения частоты и верификации полученной геометрии. Минимизацией локализованных седловых точек в прямом и обратном направлениях были получены соответствующие интермедиаты. Таким образом было показано, что все рассчитанные стационарные точки находятся на одной поверхности потенциальной энергии.

Структура белок-субстратного комплекса

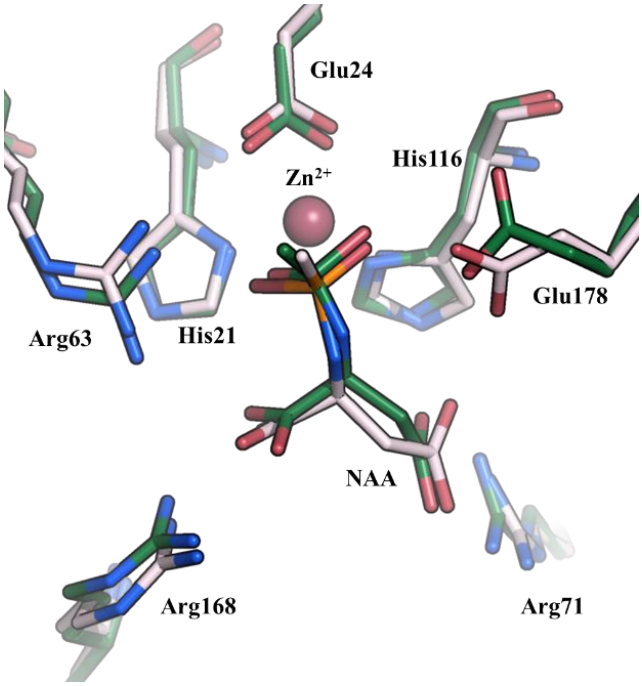


Рисунок 9. Наложение расчётной геометрии I1 и кристалла 2O4H с аналогом тетраэдрического интермедиата NPA.

Оптимизированная геометрия первого интермедиата (I1) согласуется с расположением тяжёлых атомов в кристаллической структуре 2O4H (рис. 9), что свидетельствует о корректности выбранной модели описания hAsp (табл. 1). В качестве реакционной координаты для перехода I1 – ES было

выбрано расстояние между кислородом молекулы воды (Ow) и карбонильным углеродом NAA (Cs). В структуре I1 это расстояние составляет 1,48 Å.

Карбоксильная группа Glu178 протонирована в результате нуклеофильной атаки, второй протон каталитической молекулы воды связан с атомом Ow в тетраэдрическом интермедиате (рис. 10). Переходное состояние TS1 стабилизировано солевыми мостиками, образованными между карбоксильными группами NAA и Arg71 с Arg168 и сохраняющимися на всём реакционном пути от ES до EP_1P_2.

Таблица 1. Значения ключевых расстояний [Å] рассчитанной геометрии ES и кристаллической структуры 2O4H

	PDB ID 2O4H	Оптимизированная структура I1
Zn – Ow	2,43	2,61
Zn – Os	2,55	1,92
Zn – Nδ1 (His 21)	2,23	2,06
Zn - Nδ1 (His 116)	2,29	2,02
Zn – Oε1 (Glu24)	2,15	2,05
Zn – Oε2 (Glu24)	2,62	2,58
Ow– Oε2 (Glu178)	2,93	2,66
Ns - Oε1 (Glu178)	3,74	3,40
Oδ1 (NAA) – Nη2 (Arg168)	2,94	2,67
Oδ2 (NAA) – Nη1 (Arg168)	3,26	2,70
Os– Nη1 (Arg63)	2,84	2,73
Os– Nη2 (Arg63)	3,00	3,55

Координационная сфера цинка в ходе всего гидролиза включала His21, Glu24 и His116. Место четвёртого интермедиата в оптимизированной структуре I1 занял карбонильный кислород Os NAA. В то же время в структуре 2O4H координационное число цинка увеличено до 5, а геометрия комплекса близка к тригональной бипирамиде (таблица 1). Такое расхождение может

быть объяснено тем, что в молекуле NPA атомы кислорода у фосфора имеют более близкие значения электронной плотности, чем атомы Os и Ow в I1.

В белковых системах цинк имеет лабильную координационную сферу, способную изменять не только состав, но даже координационное число (**КЧ**) [88, 89]. В оптимизированной структуре ES кислород каталитической молекулы воды занимает место Os в координационной сфере цинка, а расстояние Zn – Ow составляет 2,04 Å. КЧ цинка сохраняется в ES, то есть при переходе от I1 происходит исключительно изменение состава лигандов. Расстояние между атомами Ow и Cs изменяется с 1,48 Å до 2,66 Å, что соответствует классическому положению нуклеофильной атаки в цинк-зависимых пептидазах [90].

Реакционный путь от ES до разрыва пептидной связи

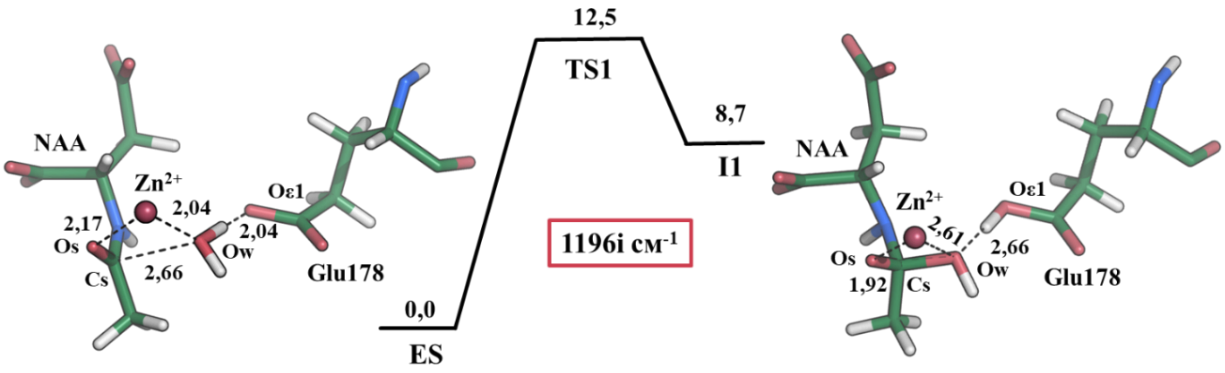


Рисунок 10. Первая стадия ферментативного гидролиза NAA.

На первой стадии гидролиза NAA происходит нуклеофильная атака каталитической молекулы воды на карбонильный углерод (Cs) субстрата с образованием тетраэдрического интермедиата (рис. 10). Расстояние между кислородом воды Ow и Cs, выбранное за координату реакции, принимает значения от 2,66 Å в ES до 1,78 Å в TS1 и 1,48 Å в I1. Величина мнимой частоты, по который проводился поиск переходного состояния TS1, составила 1196 $см^{-1}$. Высота рассчитанного барьера – 12,5 ккал/моль – согласуется с

результатами, полученными ранее для цинк-зависимой металлопротеиназы-2 [51].

В результате первой стадии, длина пептидной связи Cs – Ns в NAA увеличилась незначительно – с 1,33 Å в ES до 1,44 Å в I1. Для облегчения её разрыва протон Hw1, переданный на первой стадии на Glu178, должен быть перенесён на Ns атом субстрата. Так, расстояние между Hw1 и Ns было выбрано координатой реакции на стадии I1 – TS2 – I2 (рис. 11). Расстояние переноса составило 3,07 Å, а барьер этой стадии составил менее 1 ккал/моль. Длина пептидной связи Ns – Cs продолжила увеличиваться, достигнув 1,57 Å.

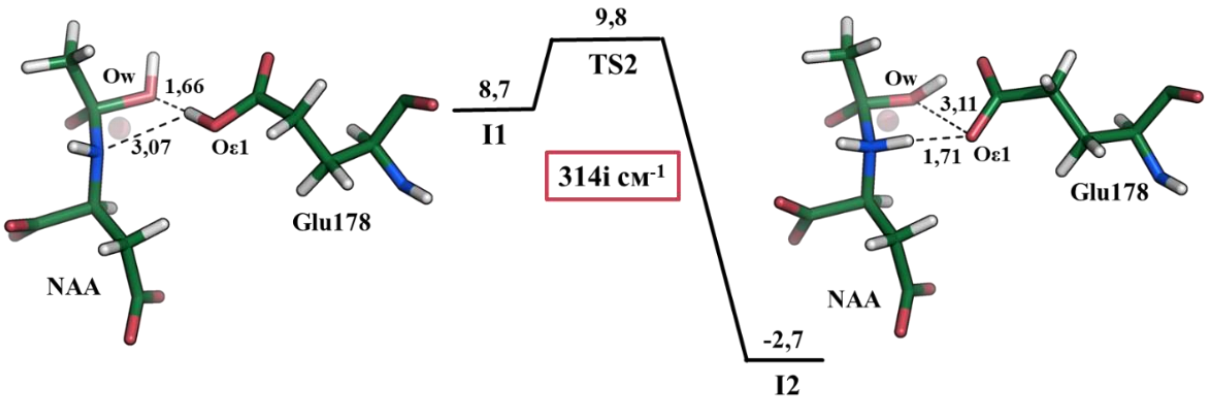


Рисунок 11. Вторая стадия реакции гидролиза - перенос протона с Glu178 на азот Ns NAA.

Разрыв связи Ns – Cs

Координатой реакции стадии разрыва пептидной связи субстрата была выбрана длина связи между Ns и Cs атомами. Третье переходное состояние (TS3) было локализовано постепенным увеличением её значения с 1,57 Å до 2,0 Å. Одновременно с разрывом пептидной связи происходит самопроизвольный перенос второго протона Hw2 на кислород карбоксильной группы NAA. Расстояние между Oε1 и Hw2 в результате третьей стадии составило 1,1 Å, а расстояние Cs – Ns увеличилось до 2,54 Å в оптимизированной структуре I3 (рис. 12).

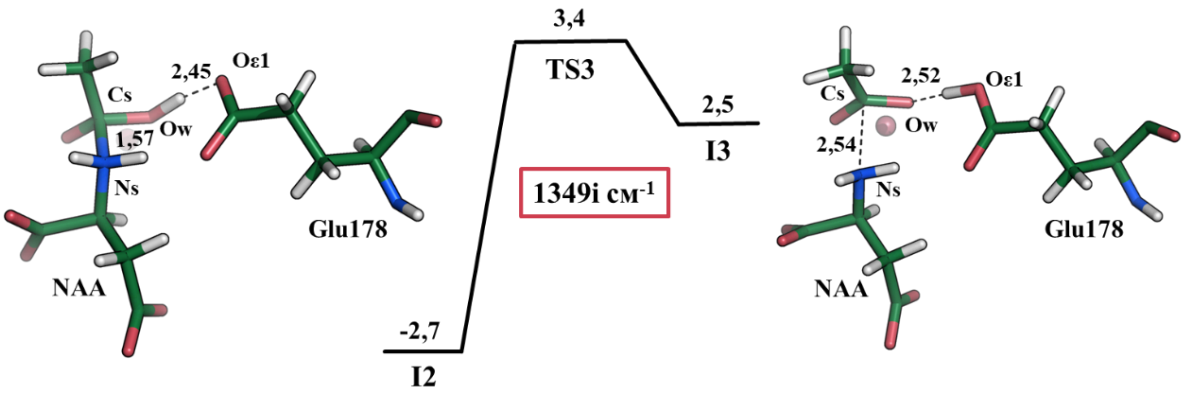


Рисунок 12. Третья стадия гидролиза - разрыв пептидной связи и сопутствующий перенос второго протона на Glu178.

Образование продуктов реакции

Для полной регенерации hAsp водород Hw2 должен быть перенесён с Glu178 на аминогруппу аспарагиновой кислоты. Поэтому на следующей стадии происходит поворот карбоксильной группы Glu178 по двугранному углу Cα – Cβ – Cδ – Cγ с 108,1° до 160,5° (рис 13). Расстояние между Oε1 атомом Glu178 и Ns атомом субстрата уменьшается с 3,96 Å до 2,61 Å. Рассчитанный барьер вращения составил 8,6 ккал/моль, что сопоставимо с барьером нуклеофильной атаки. Величина энергии активации реорганизации активного сайта может быть объяснена необходимостью разрыва прочной водородной связи между Ow и Oε1 атомами.

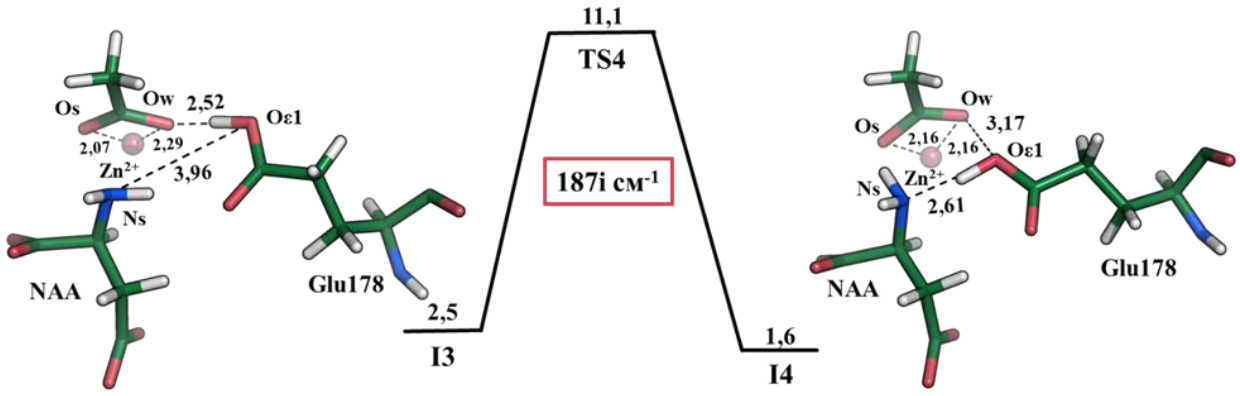


Рисунок 13. Четвёртая стадия реакции гидролиза - поворот карбоксильной группы Glu178.

В результате переноса протона Hw2 на Ns атом должна образоваться положительно заряженная аммонийная группа L-аспартата. Однако активный

сайт hAsp насыщен тремя остатками Arg63, Arg71 и Arg168, поэтому образование дополнительного положительного заряда на продукте может быть затруднено. Конформационный поиск геометрии активного сайта, благоприятствующей переносу Hw2 с Glu178, был проведён по результатам 15 пс МД траектории с КМ/ММ потенциалами, рассчитанной для I4 по описанному выше протоколу.

В МД траектории система колеблется между двумя основными состояниями: протонированный Glu178 соответствует исходному положению ацетат аниона относительно L-аспартата (рис. 14а-б), а образование аммонийной группы происходит при приближении одного из кислородов ацетата на расстояние образования водородной связи с Ns (рис. 14в-г). Барьеры TS5 и TS6 отображают достаточно плоскую поверхность потенциальной энергии на данном участке и не представляют особого интереса для дальнейшего анализа, в отличие от точки EP_1P_2.

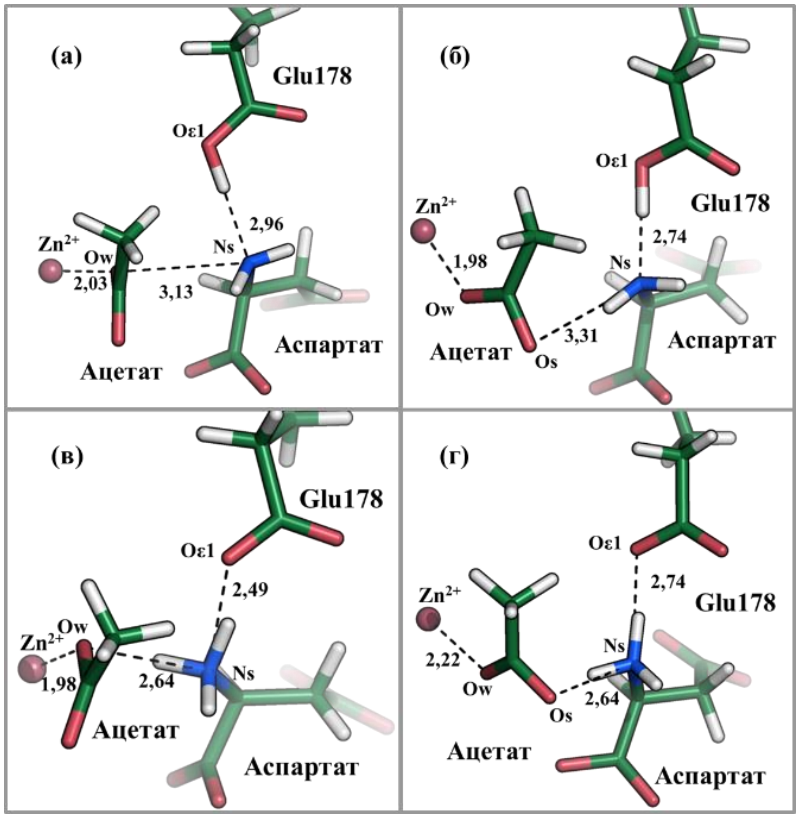


Рисунок 14. Конформационный поиск пути переноса Hw2 на продукты.

Сравнение структуры EP_1P_2 и ES показало, что после изменения состава лигандов цинка на первой стадии, на стадиях перехода от I4 к EP_1P_2 (рис. 14) место четвёртого лиганда снова занимает Ow атом.

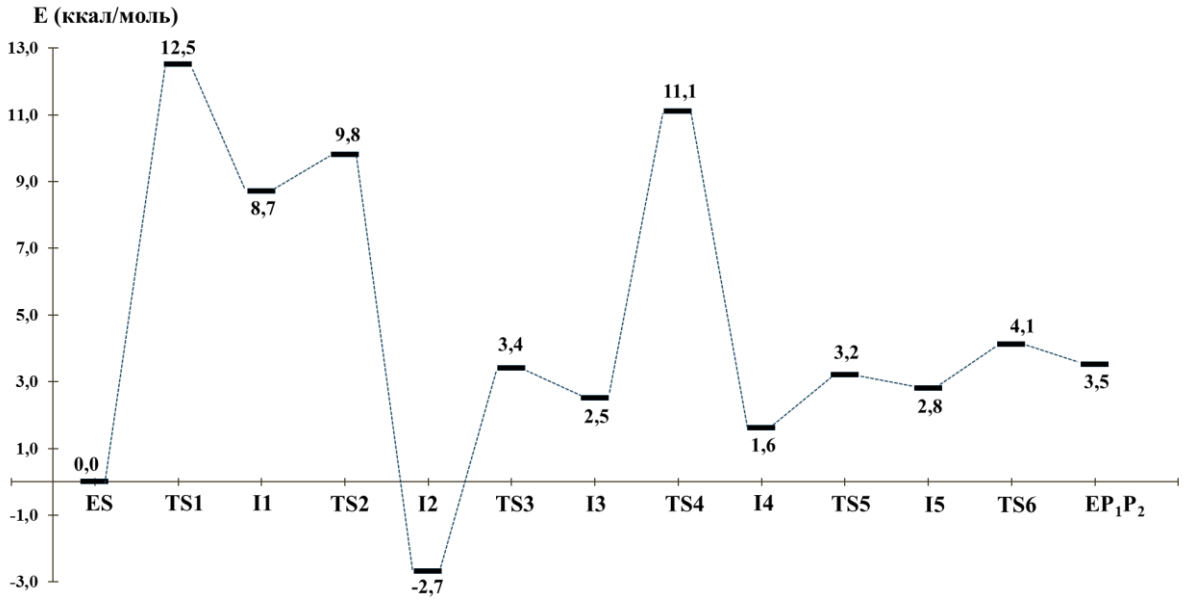


Рисунок 15. Профиль потенциальной энергии химической стадии каталитического гидролиза NAA. Значения энергии приведены с учётом поправки на энергию нулевых колебаний.

Таким образом, рассчитанный механизм пути минимальной энергии состоит из шести последовательных стадий (рис. 15). Прирост энтальпии в результате перехода от ES к EP_1P_2 составил 3,5 ккал/моль (с учётом поправки на энергию нулевых колебаний). Наибольшая энергия расходуется при переходе от ES комплекса к тетраэдрическому интермедиату (12,5 ккал/моль). Наименьшее значение потенциальной энергии у I2 (-2,7 ккал/моль), что позволяет предположить накопление этого интермедиата.

Рассчитанный механизм каталитического гидролиза NAA был подтверждён пересчётом ключевых стационарных точек в расширенной квантовой части (рис. 16). Несмотря на изменение значений потенциальной энергии, основные выводы расчёта сохраняются при переходе к расширенной квантовой части. Учитывая также тенденцию к занижению энергии стационарных точек при увеличении КМ модели, выбор первой стадии нуклеофильной атаки скорость-лимитирующей кажется недостаточно обоснованным (табл. 2).

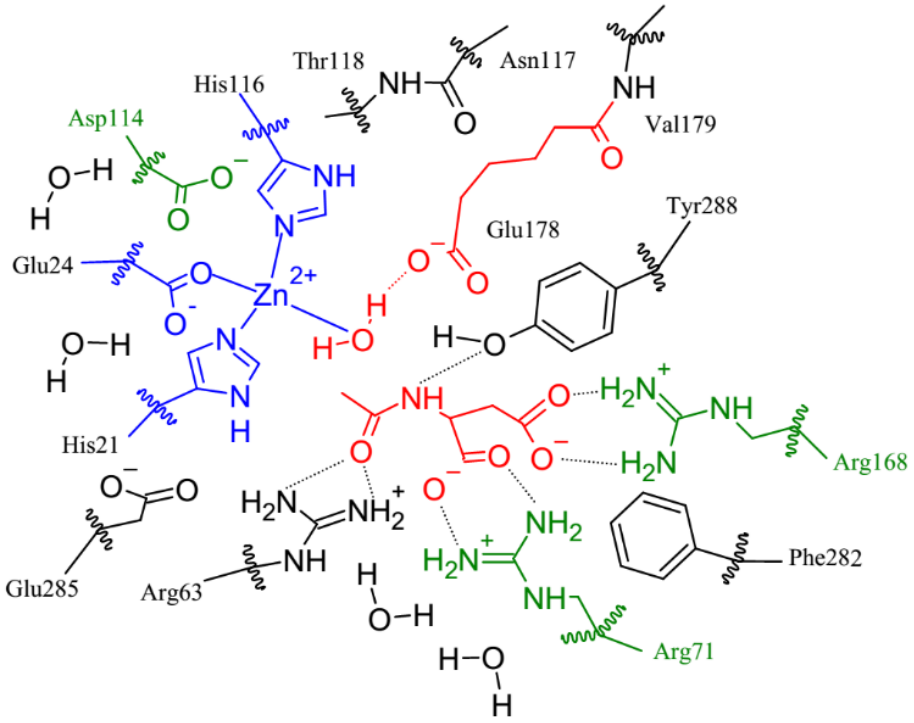


Рисунок 16. Состав расширенной квантовой части. Зелёным цветом выделены добавленные группы.

Таблица 2. Энергии стационарных точек [ккал/моль] КМ/ММ расчётов с основной и расширенной квантовыми частями.

Стационарная точка	Основной расчёт	Расширенная квантовая часть
ES	0	0
TS1	12,5	10,1
I1	8,7	6,3
I2	-2,7	-2,5
I3	2,5	1,9
TS4	11,1	6,3
I4	1,6	0,2
I5	2,8	-0,3
EP_1P_2	3,5	-0,15

Расчёт профиля потенциальной энергии химической стадии ферментативной реакции, несомненно, ключевой этап в теоретическом описании механизма. Однако для корректного сравнения с экспериментом

необходимо также учесть диффузионные стадии: образование комплекса ES и выход ацетата и аспартата в раствор. При сопоставлении рассчитанных параметров с экспериментальными константами уравнения Михаэлиса-Ментен это тем более необходимо, поскольку диффузионные стадии в явном и неявном виде входят в значения K_m и k_{cat}.

Глава 3. Полный каталитический цикл hAsp

Диффузионные стадии гидролиза NAA были описаны в подходе молекулярной динамики с потенциалами силового поля CHARMM [1]. Аналогичный подход был применён к описанию нековалентного ингибирования ацетилхолинэстеразы [4-6, 8].

Молекулярная динамика

Метод классической молекулярной динамики позволяет следить за эволюцией системы во времени, численно интегрируя уравнения движения Ньютона [91]:

$$-\frac{dV}{dr} = m\frac{d^2r}{dt^2}.$$

Вектор ***r*** представляет декартовы координаты всех атомов системы и имеет размерность *3N*. *V(r)* – потенциальная энергия системы, определяемая силовым полем и, следовательно, имеющая аналитическое решение. Общие выражения для неё уже обсуждались выше.

Полная энергия системы может быть записана следующим образом:

$$E_{tot} = \sum_{i=1}^{N} \frac{1}{2} m_i v_i^2 + V(r).$$

По умолчанию МД система относится к микроканоническому ансамблю (*nVE*), сохраняемому при корректном выборе интегратора. В данной работе был выбран изобарно-изотермический статистический ансамбль для приведения модели в соответствие с условиями эксперимента. Моделирование в *NPT*-ансамбле помимо неизменности числа частиц, требует постоянства температуры и давления.

В МД температура системы определяется теоремой о равнораспределении кинетической энергии по степеням свободы:

$$\frac{1}{2}(3N - N_c)k_B T = \frac{1}{2}\langle \sum_i^N m_i v_i^2 \rangle_M.$$

Термостатирование системы подразумевает изменение интегрируемых уравнений движения либо прямым масштабированием скоростей, либо введением дополнительной силы, зависящей от скорости атома, к которому она приложена. В данной работе была применена модель термостата Ланжевена [92], в которой на каждый атом системы воздействует случайная сила, связанная с коэффициентом затормаживающего потенциала, уменьшающего значения скоростей частиц. Термостат Ланжевена был выбран за способность сохранять статистический ансамбль и эргодичность системы.

Давление МД задаётся через уравнение Клаузиуса с вириальной поправкой на неидеальность системы:

$$PV = Nk_B T + \frac{1}{3}\langle \sum_{i<j}^N r_{ij} f_{ij} \rangle.$$

Контроль за давлением осуществляется путём изменения параметров кубической ячейки, то есть варьируя расстояния между атомами системы. В данной работе баростатирование осуществлялось методом ланжевеновского поршня [93]:

$$\ddot{V} = \frac{1}{W}[P(t) - P_{ext}] - \gamma \dot{V} + R(t),$$

где γ – частота соударений, *R(t)* – случайная сила, подчиняющаяся гауссову распределению, а *W* – масса воображаемого поршня.

Все МД расчёты были осуществлены в *NPT* ансамбле, при 1 атм. и 300 К. Интегрирование уравнений движения проводилось скоростным алгоритмом Верле [94]. Шаг интегрирования 1 фс был выбран так, чтобы на порядок уступать периоду самого быстрого колебания системы. Расчёт молекулярно-динамических траекторий проводился в присутствии молекул воды модели TIP3P в периодических граничных условиях. Дальние электростатические

взаимодействия рассчитывались через суммирование Эвальда (Particle Mesh Ewald - **PME**). Для нейтрализации ко всем модельным системам были добавлены ионы натрия в нужном количестве. Радиус полноценного учёта невалентных взаимодействий составил 13,5 Å.

Оптимизация систем в МД проходила по следующему протоколу: 5000 шагов минимизации методом связанных градиентов, 5 нс моделирования в ансамбле NPT при 300 К и 5000 шагов минимизации. Силовые параметры для NAA были заданы силовым полем CGenFF [71].

Одним из самых параллелизуемых методов расчёта профиля свободной энергии в МД считается метод зонтичной выборки (Umbrella Sampling – **US**) [49]. В US реакционный путь разбивается на набор состояний системы, для каждого из которых параллельно рассчитываются МД траектории. При этом на значение координаты реакции накладывается ограничивающий гармонический потенциал с известной константой упругости. Профили свободной энергии для каждого отрезка совмещаются методом взвешенных гистограмм [50]. Недостатком данного метода является необходимость расчёта продолжительных траекторий для каждого из отрезков для того, чтобы система успевала покинуть локальные минимумы на поверхности потенциальной энергии.

Проблема прохождения локальных минимумов может быть решена применением комбинированного метода зонтичной выборки и алгоритма перекрещивающихся распределений (Replica Exchange - **RE**) [95]. В RE создаётся несколько копий системы с различными параметрами – например, значениями координаты реакции, температуры и др. – а расчёт их МД траекторий происходит параллельно. Периодически, через выбранное число шагов интегрирования происходит обмен координатами между копиями системы. Каждая копия занимает несколько ядер суперкомпьютерного комплекса. Достаточно частый обмен позволяет избежать задерживания

системы в локальных минимумах и более эффективно исследовать всё значимое конфигурационное пространство белковой системы.

В комбинированном методе зонтичной выборки – перекрещивающихся распределений (Hamiltonian Replica Exchange Umbrella sampling – **HREUS**) [96] на гамильтониан каждой из *n* копий системы накладывается гармонический потенциал *V (d, i)*, где параметр *i* варьируется от нуля до *n-1*, а *d* – значение координаты реакции *i*-ой копии (рис. 17). В ходе расчёта энергии соседних копий периодически сравниваются и обмениваются текущими координатами по критерию Метрополиса:

$$P\left(p_1^i \leftrightarrow p_1^j; p_2^l\right) = min\left\{1, e^{-\left[U_{12}^{ili}+U_{12}^{jlj}-U_{21}^{jll}-U_{12}^{ill}\right]/k_BT}\right\}.$$

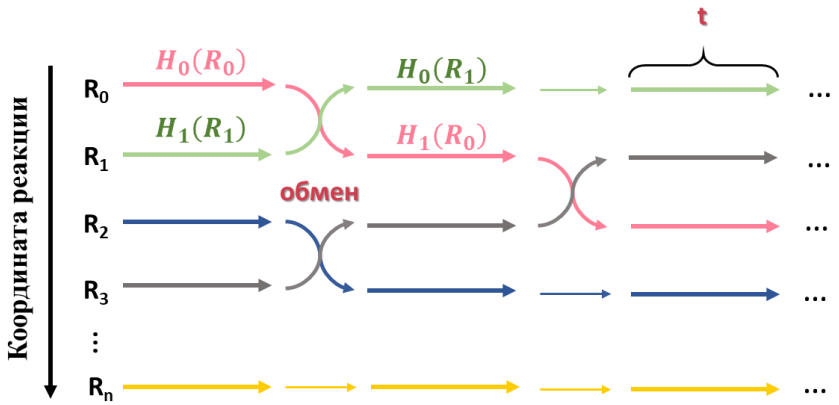


Рисунок 17. Схематическое описание алгоритма HREUS.

Расчёт профилей свободной энергии связывания NAA в активном центре и выхода продуктов гидролиза в раствор был осуществлён комбинированным методом HREUS. Моделирование было проведено в программном пакете NAMD2.10 [97] с применением соответствующих алгоритмов [98]. Обмен координатами происходил на каждых 100 фс траекторий. Для каждого процесса было рассчитано по 15 нс МД каждой копии системы. Начальные геометрии копий были получены в предварительных расчётах направленной МД (**НМД**) [99]. Неравновесное моделирование диффузионных стадий ферментативных реакций позволяет соотнести текущие значения координаты реакции и приблизительную геометрию системы. После разбиения

координаты реакции на отрезки им были поставлены в соответствие минимизированные точки траектории НМД.

Образование белок-субстратного комплекса

Координатой реакции связывания NAA в активном сайте hAsp было выбрано расстояние между катионом цинка и карбонильным кислородом субстрата. Связывание NAA сопряжено с прохождением через ворота в активный сайт, сформированные противолежащими аминокислотными парами Tyr64 – Glu290, Asp68 – Lys291 и Arg71 – Glu293. Исходное расстояние в 17,4 Å было разбито на 16 копий с шагом в 1 Å, силовая константа гармонического потенциала составила 2 ккал/(моль·Å^2). Согласно рассчитанному профилю свободной энергии, барьер прохождения NAA через ворота hAsp составил 1,7 ккал/моль, а ΔG^0 = -6,7 ккал/моль (рис. 18). При расчёте была использована только открытая конформация ворот активного сайта, поэтому значение барьера может быть недооценено.

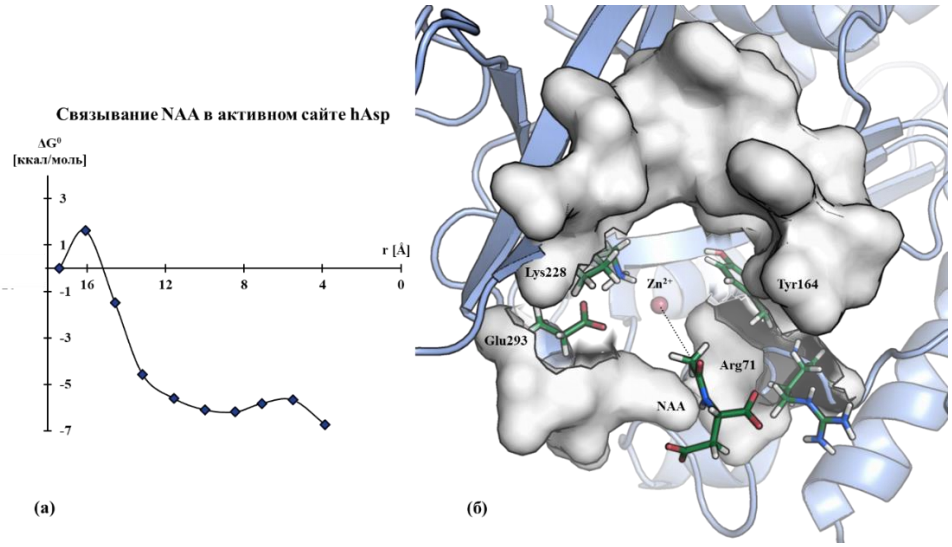


Рисунок 18. Профиль свободной энергии входа NAA в активный сайт hAsp (а). Вид конформации hAsp с открытыми воротами (б).

Выход продуктов реакции в раствор

В результате гидролиза NAA в активном центре hAsp образуются анионы уксусной и L-аспарагиновой кислот (рис. 19).

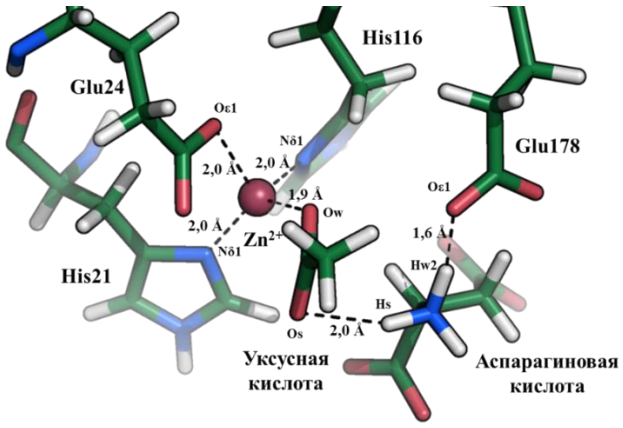


Рисунок 19. Геометрия EP_1P_2.

Анализ структуры EP_1P_2 выявил наличие двух направлений выхода продуктов: первый путь проходит по основному транспортному каналу, а второй – по вспомогательному, расположенному с противоположной стороны полости (рис. 20). Вход в него ограничен аминокислотами Gln184 и Ala286 (рис. 20). Размеры молекулы N-продукта ограничивают направление его выхода в раствор основным транспортным каналом. Однако ацетат анион достаточно мал, чтобы пройти по вспомогательному пути hAsp. Таким образом, C-продукт может диффундировать либо вслед за N-продуктом, либо независимо от него по противоположному пути.

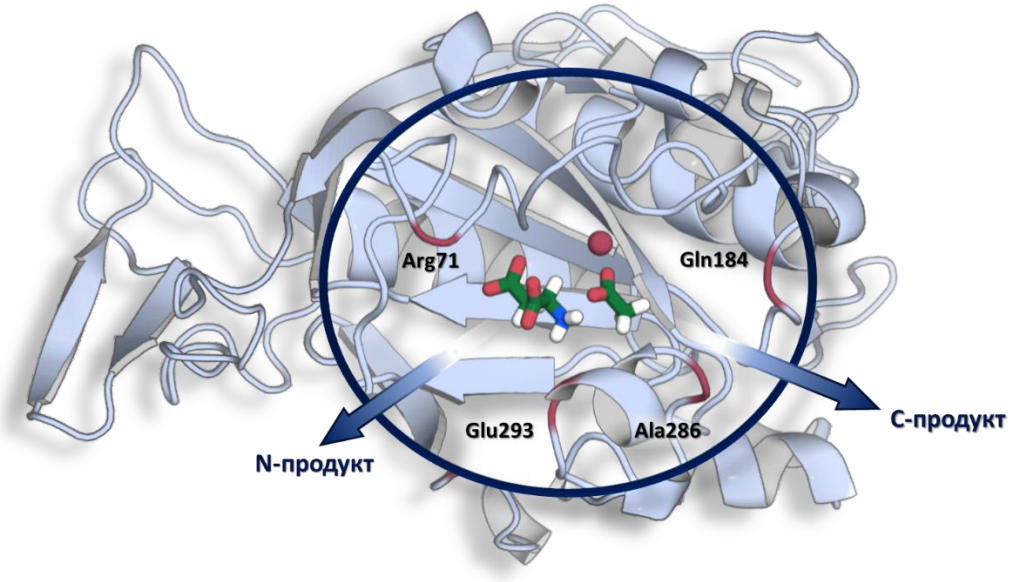


Рисунок 20. Направления выхода продуктов гидролиза.

Координатой реакции выхода L-аспартата было выбрано расстояние между Cα-атомами His116 и продукта. Начальная длина реакционного пути составила 14,2 Å. Это расстояние было разделено на 8 копий с шагом в 1,5 Å. Силовая константа гармонического потенциала была выбрана 1,2 ккал/(моль·Å^2). Свободная энергия активации этого процесса составила 3,2 ккал/моль (рис. 21), а ΔG^0 = 2,6 ккал/моль. Наибольшее значение свободной энергии соответствует разрыву электростатических взаимодействий и водородных связей между Arg71 и N-продуктом.

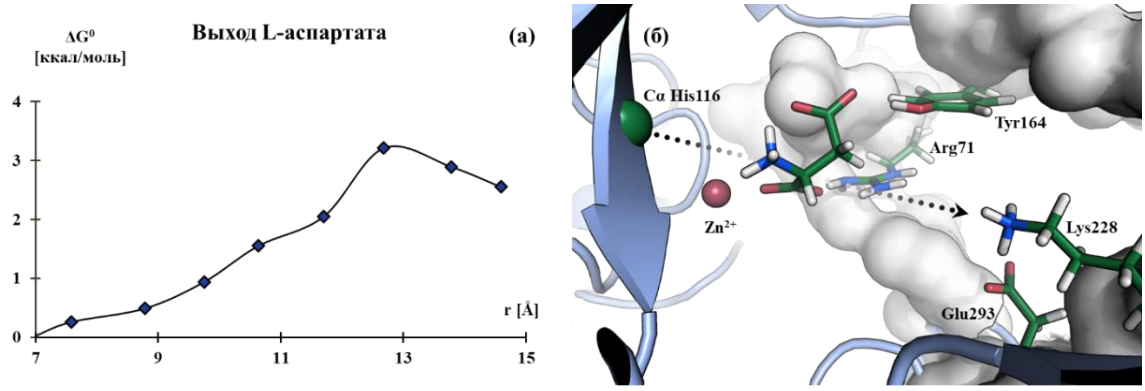


Рисунок 21. Профиль свободной энергии выхода аспартата (а). Направление выхода аспартата по основному транспортному каналу hAsp (б).

Выход С-продукта вслед за аспартатом был описан изменением расстояния между Cα-атомом Asn117 и карбоксильным углеродом продукта. Длина реакционного пути составила 9,5 Å, а ΔG^0 = 2,2 ккал/моль.

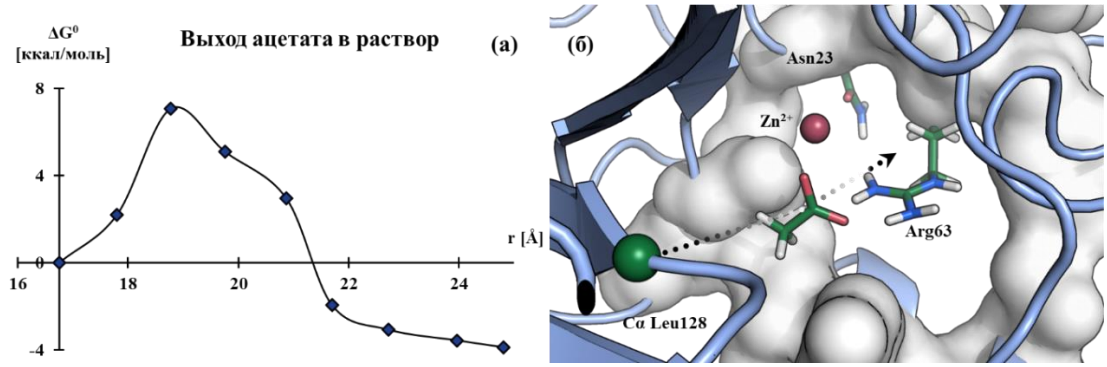


Рисунок 22. Профиль свободной энергии выхода ацетата по вспомогательному каналу (а). Направление выхода (б).

Расчёт профиля свободной энергии выхода ацетат аниона через ворота Asn23, Arg63, Gln184 и Glu290 был осуществлён по направлению вектора,

проходящего от Cα-атома Leu128 к карбоксильному углероду продукта (рис. 22). Реакционный путь был разбит на 16 копий с шагом 1 Å и константой упругости k = 1,5 ккал/(моль·Å^2). Достаточно высокий барьер активации этого процесса (7,1 ккал/моль) можно соотнести с разрывом координационной связи кислорода карбоксильной группы и катиона Zn^{2+}. ΔG^0 = -3,9 ккал/моль, что делает данный реакционный путь термодинамически более выгодным. Таким образом, в профиле свободной энергии полного каталитического цикла hAsp значения энергии стадии выхода ацетат аниона соответствуют значениям, полученным для вспомогательного пути.

Сравнение структуры PDB ID 2Q51 и регенерированной hAsp показало удовлетворительную согласованность геометрий результатов расчёта и независимых кристаллографических данных (рис. 23).

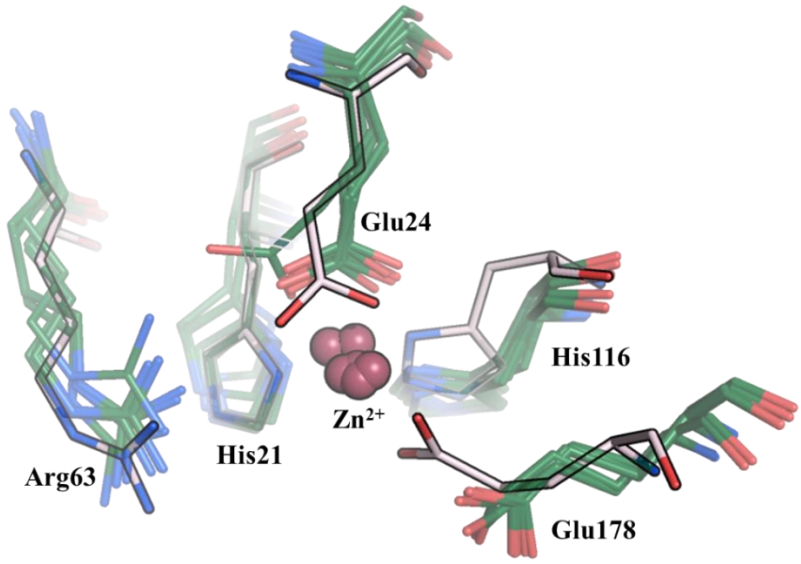


Рисунок 23. Наложение структуры апо-hAsp после моделирования (углерод – розовый) и PDB ID 2Q51 (углерод – зелёный).

Наибольшее значение среднеквадратичного отклонения расчётной геометрии принадлежит боковой цепи Glu178 (RMSD = 3,7 Å). может быть объяснено тем, что в рассчитанной структуре карбоксильный кислород Glu178 занимает место четвёртого лиганда цинка, тогда как в кристаллических структурах сравнения в координационную сферу цинка входит фосфат-анион.

Описание координационной сферы цинка

Интересной особенностью цинка в ферментативных системах является возможность изменения координационного числа в зависимости от окружения. В водном растворе катионы цинка образуют октаэдр с шестью молекулами воды, при этом стандартная длина связи Zn – O составляет 2,10 Å [100]. В белках с мотивом цинкового пальца (zinc-finger) и в абсолютном большинстве других цинк-связывающих ферментов цинк координирует четыре лиганда, однако существуют сайты, в которых КЧ цинка возрастает до 5 или даже 6 [101, 102]. Понижение координационного числа в белковом окружении принято объяснять возможностью переноса заряда с аминокислотных лигандов на катион цинка, что приводит к понижению его положительного заряда. Особенно ярко этот эффект наблюдается в системах, где цинк координирует аминокислотные остатки цистеина [103].

При молекулярном моделировании в классических силовых полях перенос заряда на катион в явном виде не учитывается, так как частичный заряд Zn^{2+} постоянен (+2e) и не зависит от состава лигандов и их числа. Эффект поляризации также не учитывается напрямую, однако использование полного заряда атома позволяет неявно включить некоторые поляризационные поправки [104].

Современное описание цинка в классической МД ограничивается в основном тремя моделями: связанной, несвязанной и поляризуемой [105].

В связанной модели взаимодействия между цинком и лигандами определяется через ковалентные связи. Такой подход позволяет наилучшим образом сохранять исходную координационную геометрию на протяжении динамической траектории. В связанной модели потенциальная энергия взаимодействия включает энергию растяжения связи, деформации валентного и двугранного углов, энергию электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий – то есть имеет стандартный вид ММ потенциала. Параметры

модели задаются стандартными методами ММ, рассмотренным ранее. Несмотря на популярность такого подхода, его применение ограничено системами со стабильным окружением цинка. В hAsp, как было показано в **главе 2**, координационная сфера цинка достаточно лабильна. Важным аспектом является также и то, что зачастую геометрия сайтов связывания металлов не сохраняется при переходе от кристаллической формы к раствору. Поэтому применение связанной модели в данной работе нежелательно.

В несвязанной модели координационные связи описываются электростатическим потенциалом и энергией ван дер Ваальса. В результате углублённой параметризации силового поля с использованием *ab initio* данных и экспериментальных термодинамических величин, может быть достигнуто хорошее соответствие геометрий координационной сферы цинка ММ модели и теоретических подходов более высокой точности [106]. Однако было показано, такая модель описания координационных связей цинка имеет тенденцию к завышению КЧ до 6 [107].

Поляризуемая модель описания координационной сферы цинка предполагает применение поляризуемых силовых полей. Эффект поляризации критически важен для описания координационных связей, в некоторых системах его вклад составляет до 10-20% полной энергии системы [108]. Основным препятствием в применении такой модели является качество параметров поляризуемых силовых полей. Усложнённые схемы их параметризации и ограниченная универсальность зачастую приводят к худшему описанию, чем в классических ММ силовых полях [107].

В силовом поле CHARMM36 для описания координационной сферы цинка применяется кулоновский потенциал и приближение Леннарда-Джонса. Параметры ван дер Ваальса для катиона цинка были подобраны так, чтобы наилучшим образом описывать экспериментальную радиальную функцию распределения и с высокой точностью рассчитывать свободную энергию сольватации модельных систем [106]. Причём в процессе параметризации учёт

дальнодействующих нековалентных взаимодействий был ограничен радиусом в 15 Å. Одной из модельных систем параметризации CHARMM была структура белка карбоксипептидазы А. Ошибка расчёта длин координационных связей по сравнению с кристаллической структурой для модельной системы не превышает 0,1 Å [106]. Учитывая структурное и функциональное родство карбоксипептидазы А и hAsp, использование простой несвязанной модели для описания взаимодействий цинка может быть проведено с удовлетворительной точностью.

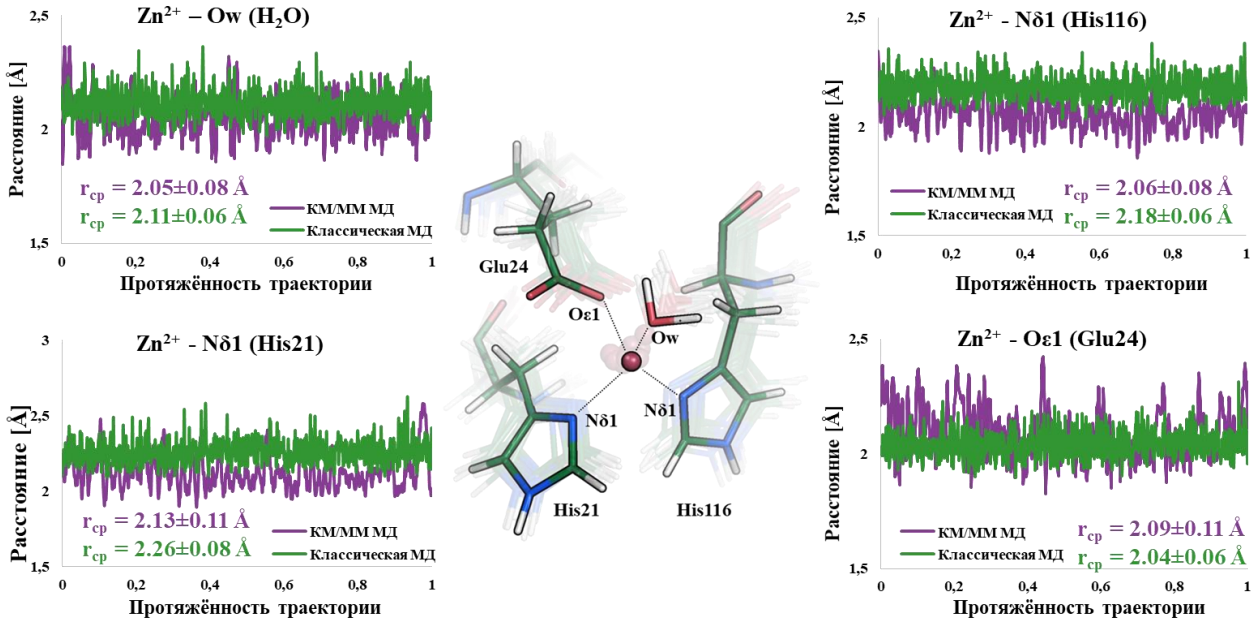


Рисунок 24. Распределения длин координационных связей по результатам классической МД (8 нс) и КМ/ММ МД (15 пс). Длины траекторий представлены в нормированном виде.

По результатам КМ/ММ оптимизации стационарных точек, координационная сфера цинка на протяжении всех элементарных стадий химической реакции достаточно стабильна: три аминокислотных лиганда His21, Glu24 и His116 сохраняют связь с катионом цинка. Однако место четвёртого лиганда в системах ES и EP_1P_2 занимает кислород Ow каталитической молекулы воды, а в структурах переходных интермедиатов он замещается на карбонильный кислород Os NAA. Ввиду уникальных свойств катиона цинка в белковых системах, необходима верификация геометрий, полученных в КМ/ММ оптимизации, динамическими методами.

Таблица 3. Значения длин координационных связей цинка по результатам расчётов в различных приближениях.

	КМ/ММ	КМ/ММ (расширенная квантовая часть)	КМ/ММ МД	Классическая МД
Zn – Oε1 Glu24	2,18	2,18	2,09±0,11	2.04±0,06
Zn – Nδ His21	2,18	2,16	2,13±0,11	2,26±0,08
Zn – Nδ His116	2,06	2,04	2,06±0,08	2,18±0,06
Zn – H_2O	2,04	2,02	2,05±0,08	2,11±0,06

Координационная сфера цинка была описана методами молекулярной динамики с потенциалами КМ(PBE/DZVP-PW) /ММ(CHARMM). КМ/ММ оптимизированная геометрия комплекса ES была использована для начального приближения системы. Квантовая часть включала все функциональные группы КМ/ММ расчёта. В рассчитанной траектории координационная сфера цинка оставалась достаточно стабильной на протяжении 15 пс динамики. Средние значения длин связей в модели КМ/ММ МД согласуются с результатами КМ/ММ оптимизаций с различными КМ частями (табл. 3). Полученные распределения длин координационных связей были сопоставлены с результатами классического МД расчёта ES комплекса длиною в 8 нс (рис. 24). В качестве стартовой геометрии для ММ системы была также выбрана КМ/ММ оптимизированная структура ES. Рассчитанные средние значения длин связей классической МД отличаются от КМ/ММ МД подхода на ~0,1 Å, что является неплохим результатом для описания геометрии комплекса переходного металла в классическом приближении

(табл. 3). Стоит отметить, что тетраэдрическая координационная геометрия цинка сохраняется на протяжении классической МД траектории.

Профиль свободной энергии каталитического цикла hAsp

Построение профиля свободной энергии полного каталитического цикла hAsp предполагает переход к значениям ΔG^0 от значений потенциальной энергии стационарных точек химической стадии гидролиза. Изменение теплоёмкости и энтропийный вклад при переходе к 298° К были описаны моделями гармонического осциллятора и жёсткого ротатора.

По результатам расчёта профиля свободной энергии (рис. 25) полного каталитического цикла аспартоацилазы можно оценить скорость-лимитирующие стадии ферментативной реакции, вносящие наибольший вклад в наблюдаемую k_{cat}.

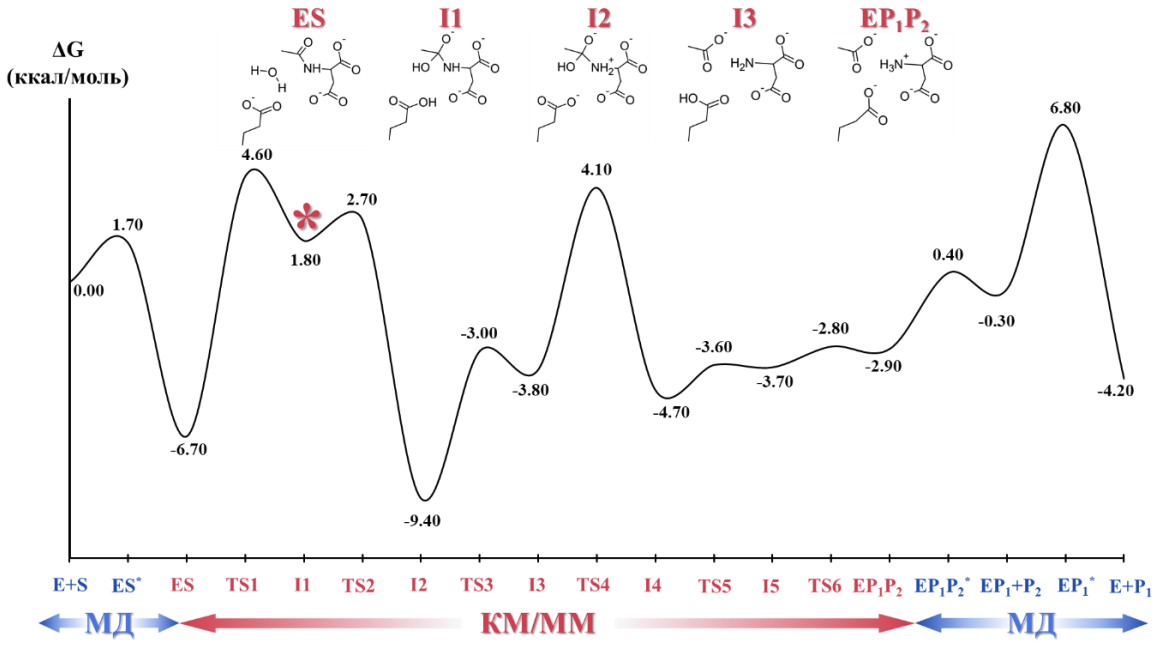


Рисунок 25. Профиль свободной энергии полного каталитического цикла hAsp.

Наибольшая энергия активации принадлежит первой химической стадии реакции – нуклеофильной атаке (11,3 ккал/моль). При расчёте стационарной точки TS1 в расширенной квантовой части барьер потенциальной энергии был понижен с 12,5 ккал/моль до 10,0 ккал/моль. Согласно расчётным

литературным данным, величина энергии активации данной элементарной стадии составляет 16 ккал/моль, что, по теории активированного комплекса, согласуется с экспериментальным значением k_{cat} [49]. Однако, как было отмечено выше, и корректность модели, и точность описания в [49] не позволяют считать результат эталонным. Стоит отметить, что в системах цинк-зависимых белков понижение значений реакционных барьеров, рассчитанных методом DFT/PBE0 по сравнению с результатами CCSD(T) составляет 1-3 ккал/моль [109]. И в общем случае для цинк содержащих гидролаз рассчитанные барьеры нуклеофильной атаки, описанные в литературе, не превышают 13 ккал/моль [109]. К тому же, структура и аминокислотная последовательность активного сайта hAsp соответствует структуре карбоксипептидаз типа А. Каталитическая константа этих ферментов составляет ~ 10^4 c^{-1}, что соответствует величине барьера в 11 ккал/моль [110]. Таким образом, можно предположить, что вклад первой стадии в наблюдаемую величину k_{cat} не является определяющим.

Полученные барьеры реакции были использованы для расчёта кинетических кривых в программном пакете Kinet. Начальные концентрации фермента и субстрата были выбраны согласно условиям кинетического эксперимента в [34]. Полученные кинетические кривые позволяют применить квазистационарное приближение ко всем интермедиатам на пути от ES к EP_1P_2 ввиду малости их концентраций по сравнению с содержанием продуктов и реагентов (рис. 26).

Профиль свободной энергии полного каталитического цикла hAsp помимо наиболее высокого барьера первой химической стадии реакции содержит как минимум два барьера сопоставимой величины – TS4 (8,0 ккал/моль) и EP_1^* (7,1 ккал/моль). Учитывая систематические ошибки использованных методов, эти состояния могут вносить равнозначный вклад в наблюдаемые каталитические константы процесса.

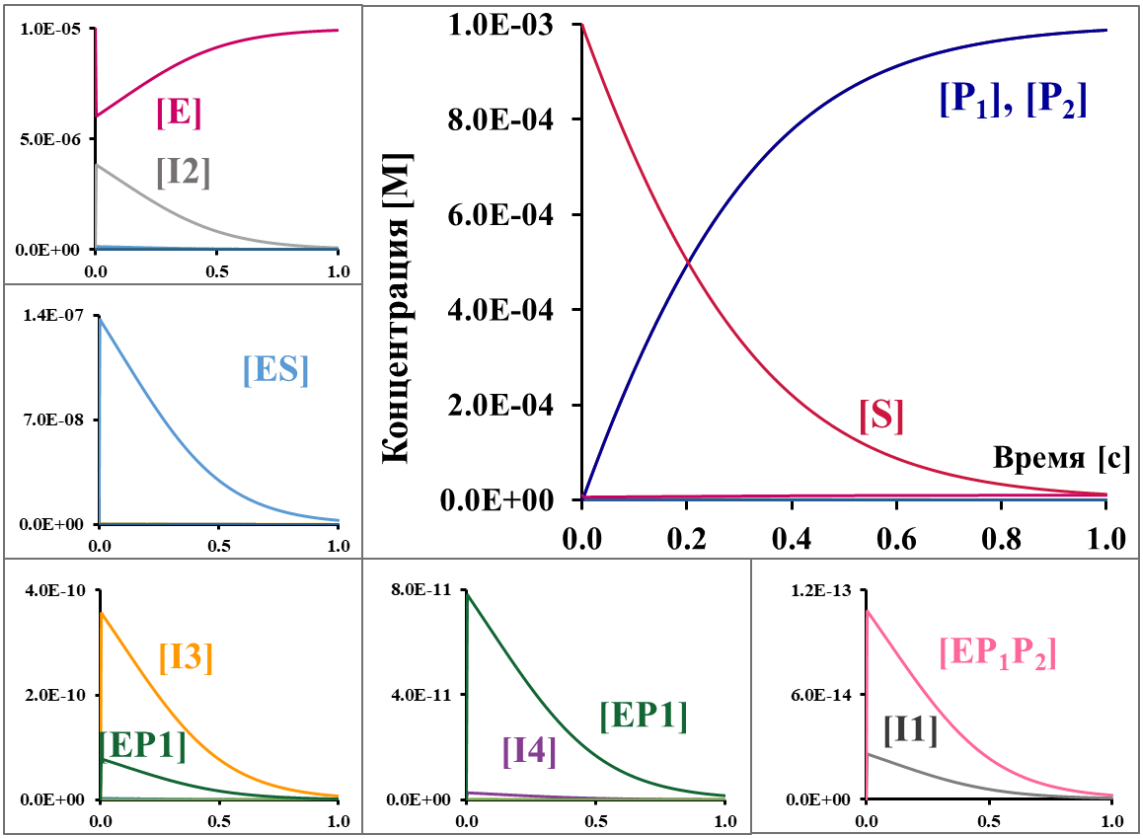


Рисунок 26. Кинетические кривые, рассчитанные по величинам энергий активации прямых и обратных элементарных стадий профиля свободной энергии полного каталитического цикла hAsp.

Для выявления скорость-определяющих состояний был использован метод энергетической модели каталитического цикла (Energetic Span Model) [111], активно применяющийся в современном катализе [112, 113]. Данный метод использует подход Христиансена и теорию активированного комплекса к квазистационарным каталитическим циклам [114] и путём учёта всех стационарных точек на поверхности свободной энергии позволяет оценить вклад каждой из них в k_{cat}. Выражение для числа оборотов реакции (turnover frequency – **TOF**) ферментативного цикла можно записать, как:

$$TOF = \frac{\Delta}{M} = \frac{e^{-\Delta G} - 1}{\sum_{i,j=1}^{N} e^{T_i - I_j - \delta G'_{i,j}}},$$

где

$$\delta G'_{i,j} = \begin{cases} \Delta G, & \text{если } i > j \\ 0, & \text{если } i \leq j \end{cases}$$

На основе выражения для TOF можно записать выражение для степени вклада данного состояния в TOF X_{TOF}:

$$X_{TOF,i} = \left|\frac{1}{TOF}\frac{\partial TOF}{\partial E_i}\right| = \frac{\sum_j e^{T_i - I_j - \delta G'_{ij}}}{\sum_{ij} e^{T_i - I_j - \delta G'_{ij}}},$$

а $\sum_i X_{TOF,Ti} = 1.$

По результатам расчёта X_{TOF} для полученного профиля свободной энергии каталитического гидролиза NAA основной вклад в k_{cat} вносят интермедиат ES и два переходных состояния – TS1 и EP_1^* - что подтверждает предварительное предположение о вкладе нехимических стадий в наблюдаемую кинетику реакции. Рассчитанная по данной модели величина наблюдаемого барьера составила 16,2 ккал/моль, что согласуется с данными эксперимента.

Глава 4. Влияние четвертичной структуры белка на каталитическую активность

По экспериментальным данным, hAsp существует в растворе в виде гомодимера. Корректный выбор модельной структуры для дальнейших расчётов предполагает изучение возможного вклада взаимодействия между субъединицами hAsp (ASPA и ASPB) в стабилизацию активной конформации.

Сопоставление динамических свойств мономера и димера hAsp

При создании начального приближения для МД модели мономера hAsp были использованы координаты тяжелых атомов шести субъединиц кристаллических структур PDB ID 2I3C, 2O53 и 2O4H для повышения репрезентативности получаемой выборки. Оптимизированные геометрии системы были использованы для шести параллельных МД расчётов длиною в 100 нс.

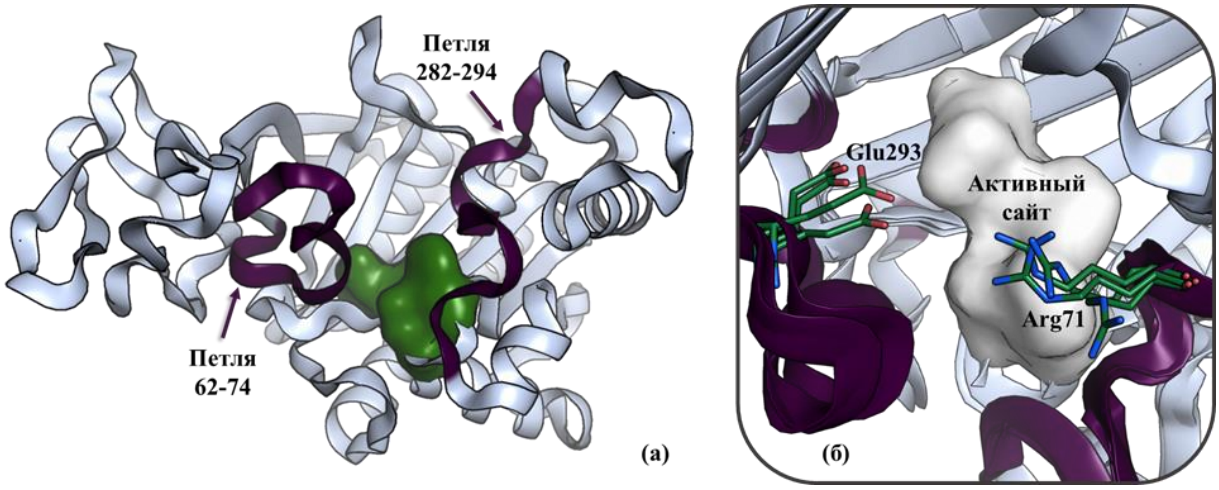


Рисунок 27. Строение транспортного канала hAsp. (а) - расположение петель 62-74 и 282-294 относительной активного центра (зелёная поверхность); (б) - ориентация ворот канала - Arg71 и Glu293 - в субъединицах кристаллических структур апо-hAsp 2I3C и 2O53.

Модель гомодимера апо-hAsp была создана по мотивам структуры 2O53, приближенной к апо-форме. Динамическое моделирование димера hAsp заключалось в параллельном расчёте пяти МД траекторий по 100 нс согласно описанному выше протоколу.

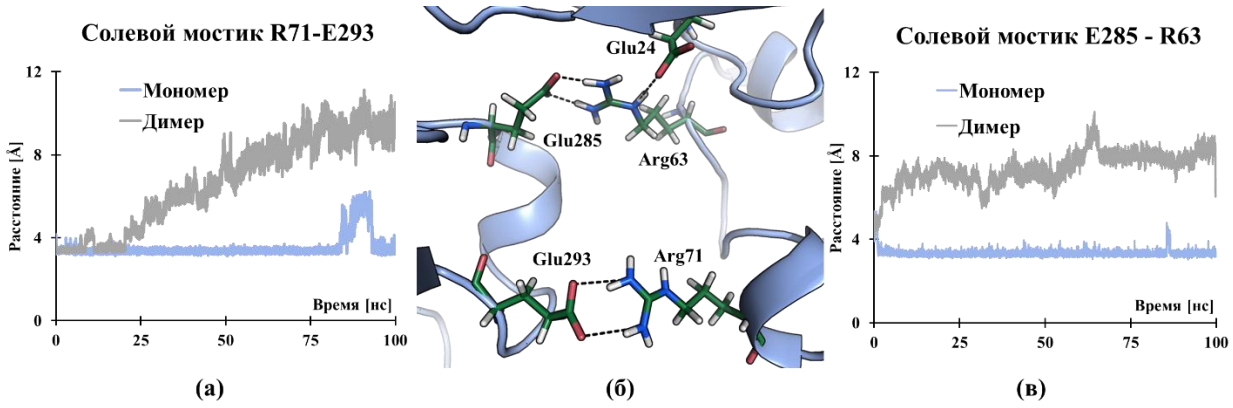


Рисунок 28. Распределение длин солевых мостиков в мономере и в димере hAsp.

Структурные данные позволяют предположить высокую подвижность ворот активного сайта, образованных петлями 62-74 и 282-294 (рис. 27а). Наложение начальных координат шести систем мономера hAsp иллюстрирует нестабильное расположение Arg71 и Glu293 (рис. 27б). Эти остатки входят в противолежащие петли, образующие главный вход в активный сайт hAsp – 62 – 74 и 282-294. Положение и подвижность этого участка цепи определяют доступность активного сайта для связывания субстрата и, следовательно, могут оказывать непосредственное влияние на каталитическую активность hAsp.

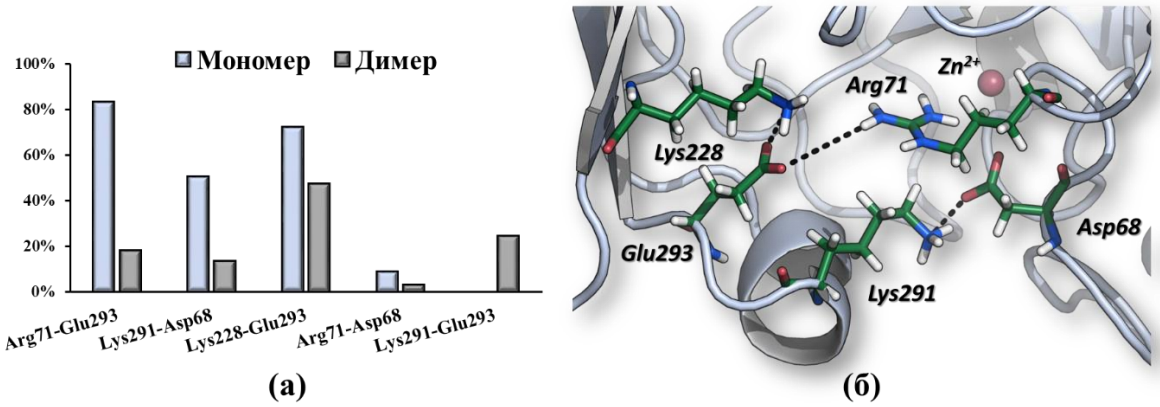


Рисунок 29. Заселённость водородных связей, образованных между противоположными аминокислотами транспортного канала hAsp.

В ансамбле состояний рассчитанных МД траекторий шести систем мономера hAsp присутствуют конформеры как открытой формы hAsp, так и закрытой. Несмотря на различия в начальных геометриях, во всех МД

траекториях равновесие между этими состояниями сдвинуто в сторону закрытой, неактивной конформации. Закрытая форма стабилизируется двумя солевыми мостиками, образованными между Arg63 и Arg71 с одной стороны и Glu285 и Glu293 – с другой (рис. 28б). Электростатические взаимодействия между этими аминокислотами сохраняются на протяжении всех МД траекторий системы мономера (рис. 28а, 28в).

Помимо солевых мостиков, в системах мономера образуется стабильная сеть водородных взаимодействий между противоположными аминокислотами ворот транспортного канала: Tyr64 – Glu290, Asp68 – Lys291, Arg71 – Glu293 (рис. 29а-б). В системе димера эти взаимодействия либо не образуются вовсе на протяжении 500 нс МД, либо их заселённость крайне мала (рис. 29а).

Димер апо-hAsp

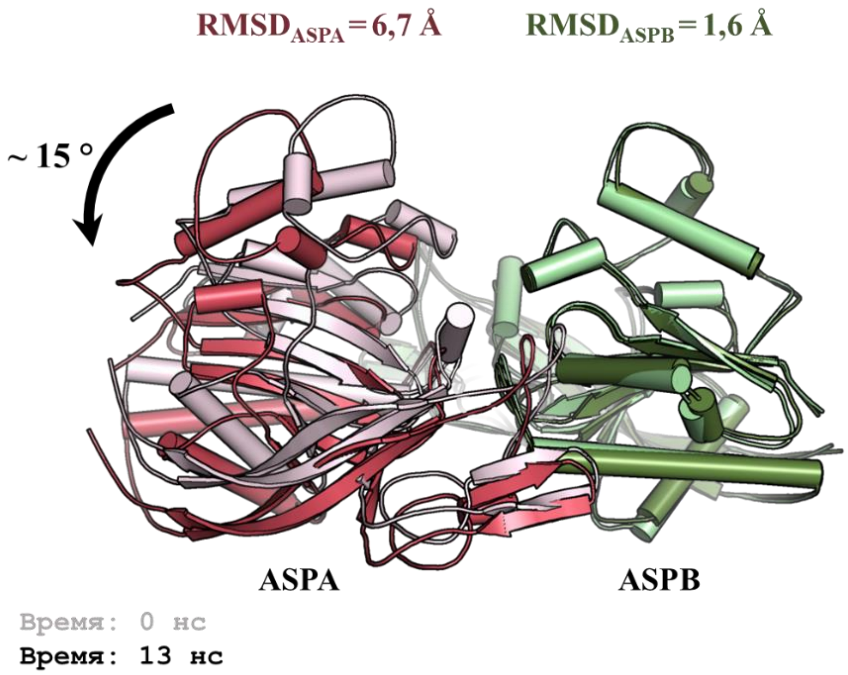


Рисунок 30. Смещение одной из субъединиц (ASPA) димера hAsp по прошествии 13 нс МД.

В течение первых 10 нс МД одна из субъединиц гомодимера неизменно смещается относительно другой на ~15°. Значения среднеквадратичного отклонения (**RMSD**) каждого из мономеров от начального положения существенно отличаются друг от друга (рис. 30). В результате этого смещения,

сохраняющегося впоследствии во всех рассчитанных параллельно МД траекториях, происходит перераспределение водородных связей и солевых мостиков, образованных на поверхности между двумя субъединицами (рис. 31).

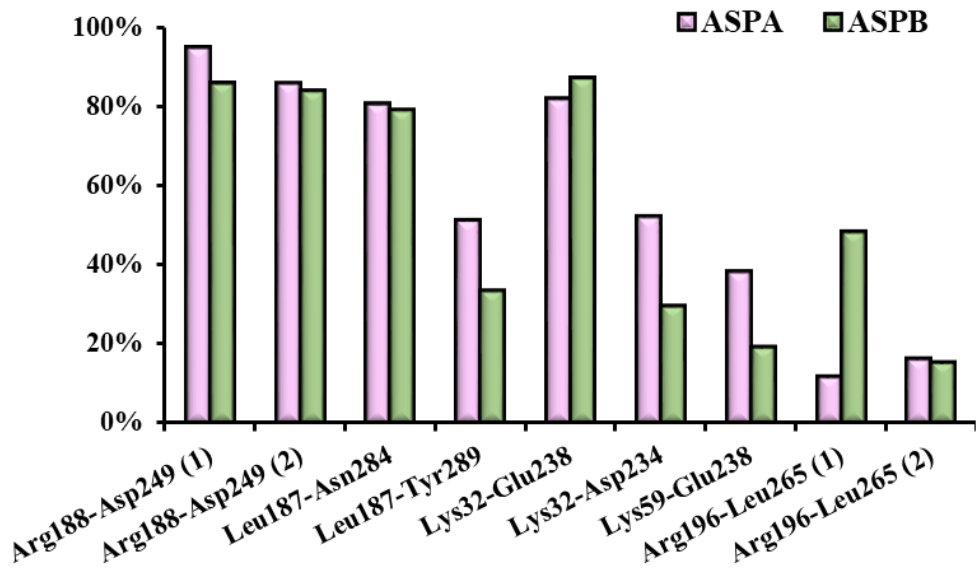


Рисунок 31. Заселённость водородных связей между ASPA и ASPB по результатам 500 нс МД.

Потеря структурной симметрии в гомодимере hAsp приводит к изменению динамических свойств смещённой субъединицы (ASPA). В субъединице с наименьшим значением RMSD (ASPB) распределение расстояний между центрами масс ворот в активный сайт соответствует закрытой конформации ворот, то есть доступ субстрата к активному сайту в ASPB оказывается затруднён. При этом, в смещённой субъединице ASPA, наоборот, происходит стабилизация открытой формы (рис. 32).

Полученные результаты позволяют предположить, что именно взаимодействие между двумя субъединицами hAsp оказывает влияние на каталитическую активность фермента. Область, расположенная между двумя белковыми, структурно идентичными, макромолекулами, является перспективной для аллостерического связывания.

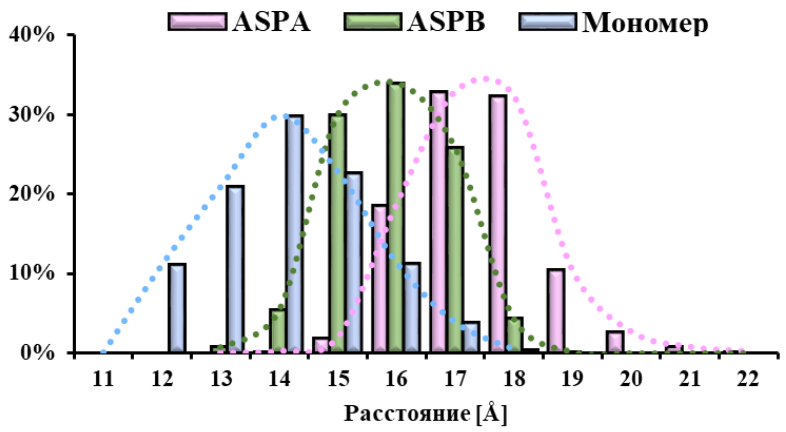


Рисунок 32. Распределение расстояния между центрами масс петель 62-74 и 282-294 для мономера hAsp и субъединиц ASPA и ASPB димера.

Влияние симметрии ферментативной системы на каталитическую функцию – явление, подробно описанное в современной научной литературе. Наиболее часто встречаются системы, в которых реализация каталитической функции возможна только при повышении симметрии белковых комплексов [115]. Однако известны примеры обратной зависимости [116]. По-видимому, система hAsp также относится к их числу.

Глава 5. Аллостерический сайт ингибирования hAsp

Современная концепция аллостерической регуляции

Классическая модель аллостерической регуляции Моно-Уаймена-Шанжё [117] основана на двух предположениях: существуют две возможные конформации фермента и в отсутствии лиганда их соотношение описывается константой равновесия; аллостерия связана с изменением формы белковой молекулы. Современное описание эффекта аллостерии подразумевает, во-первых, существование ансамбля состояний - добавление регулятора приводит к смещению равновесия между этими состояниями [118]; во-вторых, аллостерическая регуляция в общем случае может быть не связана с изменением геометрии макромолекул [119]. В отсутствии конформационных изменений, аллостерическая регуляция может быть определена через сопутствующие изменения энтальпии и энтропии или же только энтропии [120]. Современный взгляд на аллостерическую регуляцию включает не только связывание молекулы эффектора в периферийном сайте, но и любое воздействие на область белковой молекулы, не связанную напрямую с активным центром. Возмущение, создаваемое на поверхности фермента точечной мутацией, пост-трансляционной модификацией или связыванием с органическим лигандом, по множеству сигнальных путей распространяется по всей структуре белка. Аллостерическая сеть передачи биологических сигналов предполагает существование не одного аллостерического сайта [121]. Действительно, наличие обширного набора клинических точечных мутаций hAsp, влияющих на каталитическую функцию, наряду с высокой вероятностью влияния взаимодействия между ASPA и ASPB на активность свидетельствуют о высокой вероятности наличия большого количества регуляторных областей на поверхности hAsp.

Ингибирование hAsp происходит при повышении концентрации NAA, следовательно, аллостерический сайт ингибирования должен либо иметь

меньшее сродство к NAA, чем активный сайт, либо характеризоваться большей энергией активации.

Поиск сайта аллостерического ингибирования hAsp

Среди современных методов поиска побочных сайтов связывания можно выделить большой класс простых и экспрессных алгоритмов, применяющихся для анализа поверхности статичной системы. Этот класс можно условно разделить на программы, исследующие поверхность белка на наличие известных структурных мотивов аллостерических сайтов, и на программы, определяющие потенциальную способность существующих полостей к связыванию через оценку сродства к потенциальному лиганду. Однако именно структура и геометрия полостей на поверхности фермента, являются определяющими для связывания с молекулой лиганда [122, 123].

Алгоритм, используемый программным пакетом Allosite [124], сопоставляет аминокислотный состав и геометрию поверхности исследуемого белка с известными сайтами аллостерической регуляции, собранными в базе данных (Allosteric Site Database) [125]. Отобранные таким образом области проверяются на геометрическое соответствие молекуле предполагаемого лиганда. Наиболее перспективные сайты связывания ранжируются по значениям оценочных функций Allosite, включающих оценку предлагаемого сайта (Allosite score) и оценку эффекта воздействия на него, описываемого методом анализа нормальных мод (**N**ormal **M**ode **A**nalysis score) [126]. В программном пакете Allosite было обнаружено 3 потенциальных области связывания, отличные от активных центров ASPA и ASPB. В совокупности области AS1, AS2 и AS3 занимают всё пространство между двумя субъединицами hAsp (рис. 33). Незначительное отличие значений оценочной функции метода для трёх сайтов (AS1, AS2, AS3) не позволило сделать выбор в пользу одного из них (табл. 4). Однако AS3 был исключён из дальнейшего рассмотрения, так как площадь поверхности, доступная для связывания, оказалась недостаточной для связывания NAA. Объём сайтов AS1 и AS2

(>1000 Å^3 каждый) значительно превышает размеры субстрата, поэтому внутри каждого из них существует несколько возможных областей связывания субстрата.

Таблица 4. Результаты анализа поверхности hAsp в Allosite.

	Объём [Å^2]	SASA [Å^2]	Allosite Score	NMA score
AS1	1443	853	0.78	0.854
AS2	1182	515	0.76	0.999
AS3	443	297	0.77	0.352

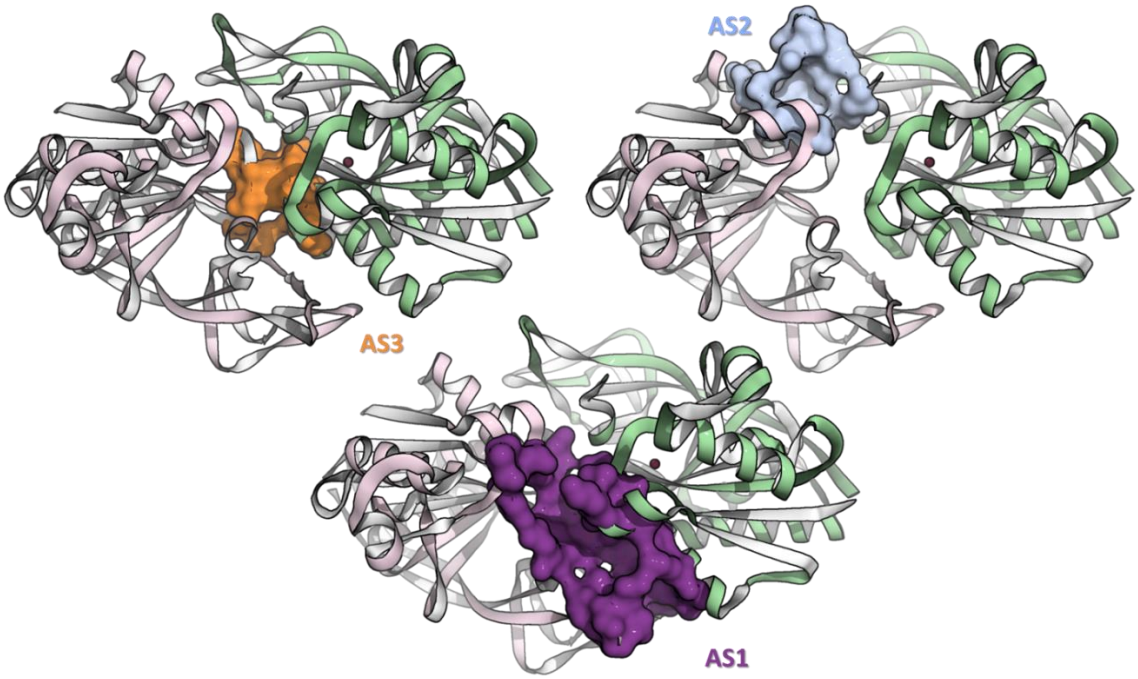


Рисунок 33. Расположение сайтов, обнаруженных Allosite.

Локализация сайта связывания NAA и апробация полученных результатов были проведены с помощью алгоритма программного пакета SiteMap [127], оценивающего энергию взаимодействия функциональных групп выбранного сайта с субстратом. Оценочные функции метода SiteScore и DScore включают оценку геометрии, размеров, доступности сайта, а также учитывают негативный вклад от повышенной гидрофильности обнаруженного сайта. Среди шести сайтов, обнаруженных SiteMap, два также принадлежат активным сайтам hAsp. Расположение остальных областей совпадает с областями AS1 и AS2: сайт SM1 также расположен в пространстве между

ASPA и ASPB (рис. 34), содержит в себе область SM2 и частично перекрывается с AS1, незначительно уступая ему в объёме (1291 Å^3). Значения оценочных функций SiteMap для сайта SM3 оказались значительно ниже, чем для SM1 и SM2, поэтому он был исключён из дальнейшего рассмотрения (табл. 5).

Таблица 5. Результаты анализа поверхности hAsp в SiteMap.

	Объём [Å^3]	Гидрофобность	Гидрофильность	DScore	SiteScore
SM1	1291	0.605	1.016	1.037	1.015
SM2	203	0.910	1.186	0.93	0.986
SM3	113	0.206	0.992	0.674	0.702

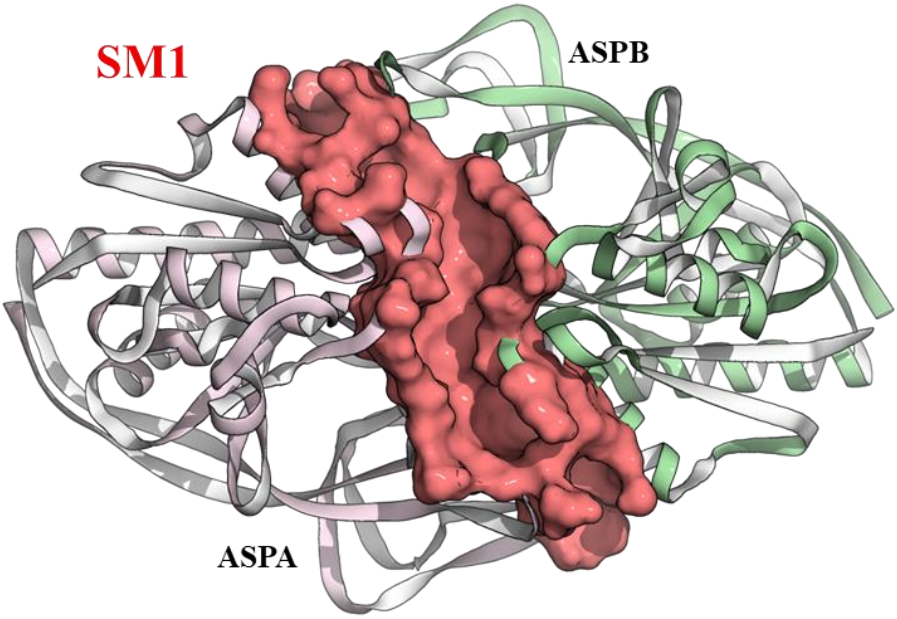


Рисунок 34. Положение аллостерического сайта, обнаруженного SiteMap.

По результатам исследования поверхности димера hAsp алгоритмами двух классов было установлено, что наиболее перспективная область для связывания NAA расположена на поверхности между двумя субъединицами, что согласуется с результатами анализа динамики апо-hAsp. Однако обнаруженная полость слишком велика для однозначного определения сайта связывания NAA. Для его локализации был проведён расчёт молекулярного докинга в программном пакете Autodock4.2 [128]. В Autodock реализован

ламаркистский генетический алгоритм, усиленный процедурой локального поиска [129].

Всё пространство было разделено на пять перекрывающихся коробок, в каждой из которых был проведен молекулярный докинг на 300 шагов с популяцией 10^4 особей, потомством в 27 x 10^4, частотой кроссовера и мутации 0,8 и 0,2 соответственно и критерием элитизма равным 1. Исходная геометрия NAA для докинга была предварительно оптимизирована методом Хартри-Фока в базисе 6-31G*. Системе были присвоены частичные заряды по методу Гестайгера. В процессе докинга варьировались 4 двугранных угла NAA. Исходная геометрия белковой молекулы была предварительно оптимизирована и совпадала с исходной структурой для расчёта апо-формы hAsp.

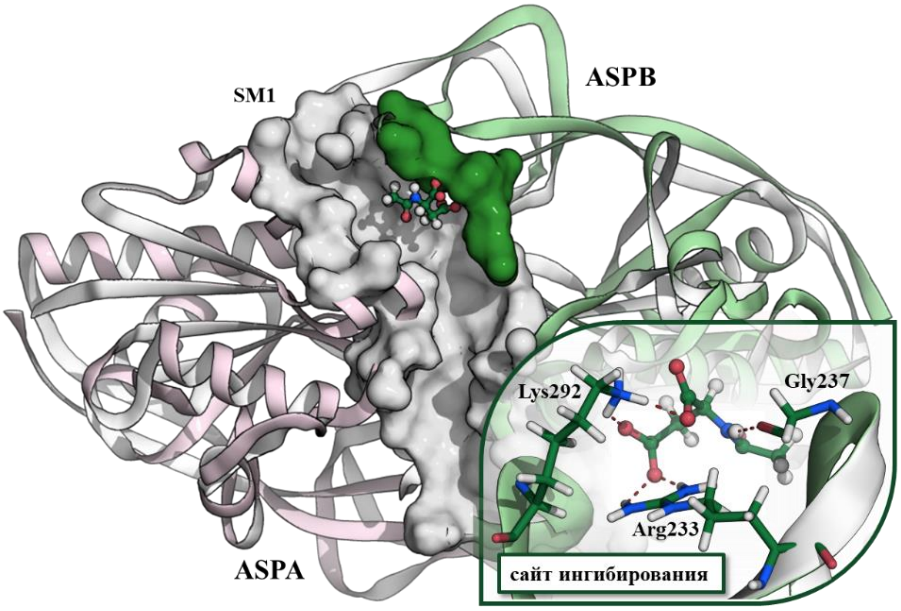


Рисунок 35. Положение предполагаемого сайта аллостерической регуляции.

По результатам докинга, наибольшим сродством к NAA обладает сайт, расположенный в пространстве между ASPA и ASPB, на поверхности последнего (рис. 35). Свободная энергия связывания докинга была оценена в -4,7 ккал/моль. Заселённость данного сайта в результатах докинга составила 78%, а следующий по заселённости сайт (11%) обладал сродством в

-2,6 ккал/моль. Так, в результате докинга по поверхности между ASPA и ASPB был выделен один предполагаемый сайт аллостерической регуляции hAsp.

Структура hAsp:NAA(inh), полученная в результате докинга, была использована в качестве начальной для всех последующих МД расчётов системы.

Расположение предлагаемого сайта подразумевает высокую вероятность самопроизвольного связывания NAA. Алгоритм ускоренной молекулярной динамики [130] был использован в работе для качественной оценки вероятности связывания NAA в предлагаемом сайте при повышенных концентрациях NAA. Данный метод позволяет с большей эффективностью преодолевать невысокие барьеры, разделяющие конформационные состояний системы, используя добавочный член в выражении для потенциальной энергии, когда её значение становится меньше порогового:

$$V^*(r) = V(r) + \Delta V(r),$$

где $\Delta V(r)$ – добавочный потенциал:

$$\Delta V(r) = \begin{cases} 0, & V(r) \geq E \\ \dfrac{(E - V(r))^2}{\alpha + E - V(r)}, & V(r) < E \end{cases}$$

E – пороговое значение энергии системы, обычно совпадающее со средним значением энергии равновесной траектории. Метод ускоренной МД успешно применялся в рамках данной работы и для изучения роли фермента ацетилхолинэстеразе в агрегации β-амилоида [4].

Была рассчитана траектория ускоренной МД длиною в 50 нс для системы димера hAsp с десятью молекулами NAA, расположенными на расстоянии не менее 10 Å от поверхности белка. На протяжении 35% расчётного времени ингибирующий сайт был связан с молекулой субстрата, что подтверждает гипотезу о высокой вероятности образования комплекса при повышенной концентрации субстрата (рис. 36).

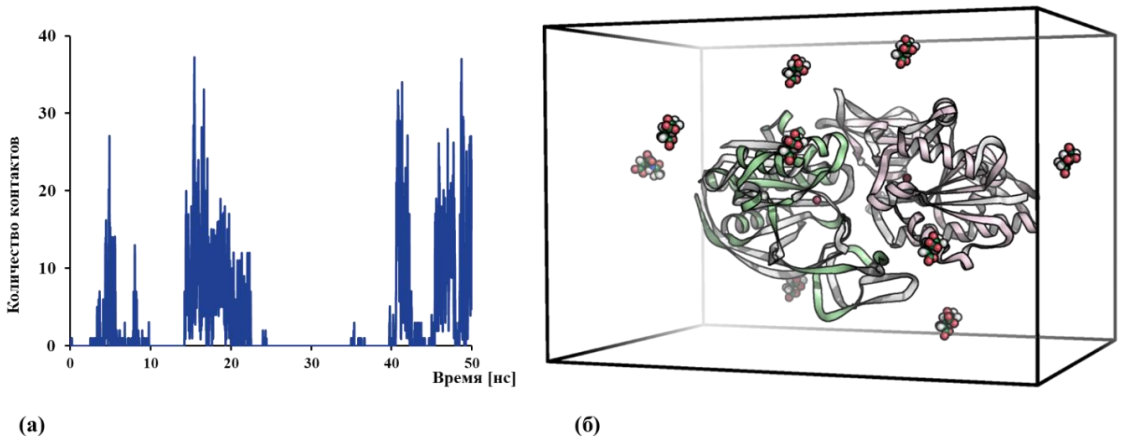


Рисунок 36. Количество контактов между атомами NAA и атомами аминокислот, формирующих сайт аллостерического ингибирования hAsp (а). Система hAsp и 15 молекул NAA в водной оболочке (б).

Молекулярная динамика hAsp:NAA(inh)

Для комплекса hAsp с NAA в аллостерическом сайте были рассчитанны 5 параллельных МД траекторий длиною в 100 нс.

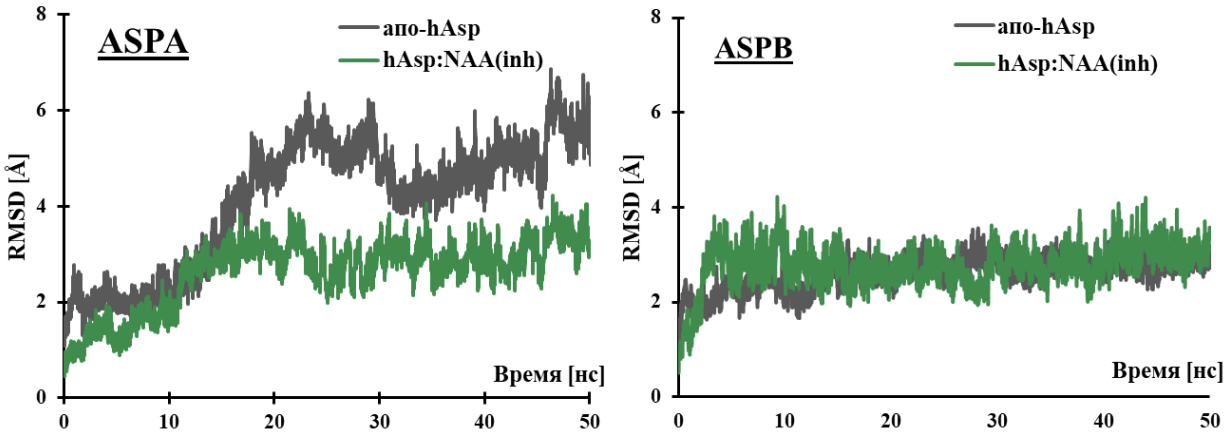


Рисунок 36. Зависимость среднеквадратичного отклонения ворот транспортных каналов (Arg71, Tyr164, Lys228, Glu293) ASPA и ASPB от времени моделирования.

По полученным траекториям были рассчитаны усреднённые значения среднеквадратичных отклонений для петель, образующих вход в активный сайт hAsp. Сравнение этих величин с полученными ранее значениями для апо-hAsp показало, что связывание в обнаруженном аллостерическом сайте приводит к понижению подвижности ворот субъединицы ASPA, при том, что подвижность ASPB сохраняется при связывании NAA (рис. 36). Образование

hAsp:NAA(inh) приводит к стабилизации закрытой формы не только в ASPB, но и в ASPA (рис. 37). В результате, вероятность образования каталитически активного белок-субстратного комплекса ES падает.

Тот факт, что аллостерический сайт находится на поверхности одного мономера, а эффект оказывается на другой, нуждается в более детальном описании. Поиск путей передачи сигнала в макромолекулярных комплексах может быть осуществлён новейшим методом анализа динамических траекторий – методом динамического сетевого анализа (Dynamical Network Analysis) [131].

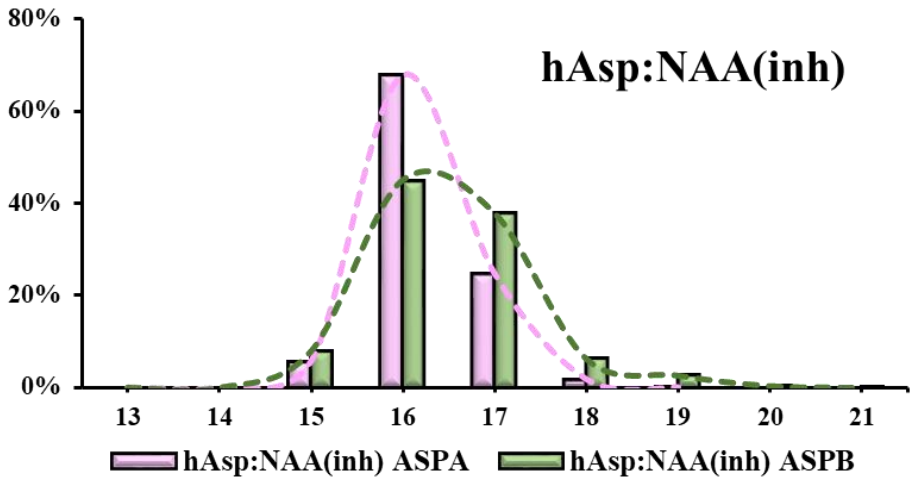


Рисунок 37. Распределение расстояния между центрами масс противоположный петель 62- 74 и 282-294 hAsp:NAA(inh).

Динамический сетевой анализ

Сетевой анализ применяется повсеместно для описания и предсказания динамических свойств сложных систем. Он является частью теории графов и позволяет не только разделить массивы данных на отдельные группы, но и найти наиболее оптимальный путь, связывающий любые два элемента сети. Сегодня сетевой анализ активно применяется практически во всех областях человеческой деятельности от физики элементарных частиц до социологии.

Граф характеризуется количеством вершин – его элементов – и рёбер – связей между ними. Все рёбра имеют свой вес, относящийся к вероятности

перехода по этой связи или к её сродству, или к амплитуде и т.п. В сетевом анализе динамики белка вершины представляют части белковой структуры: отдельные атомы, функциональные группы или даже целые домены белковых макромолекул (рис. 38).

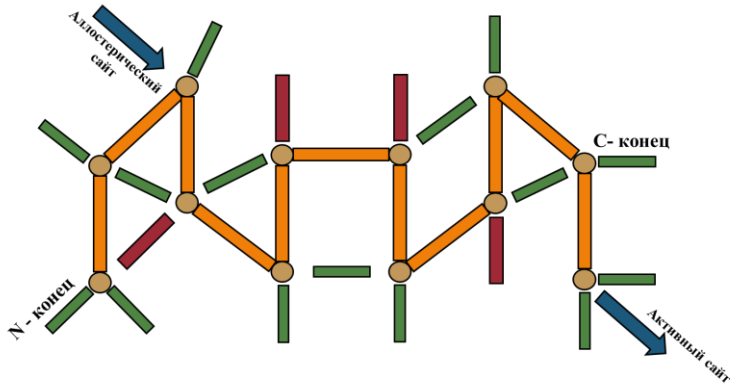


Рисунок 38. Схематическое изображение белковой цепи и сигнальных аллостерических путей передачи сигнала.

Рёбра между ними могут быть определены по-разному: по образованию водородных связей между вершинами, по расстоянию между Cα атомами, по конформационным переходам (если вершины графа – конформации белка), по наличию переходных состояний и т.д.

В данной работе в качестве вершин графа были выбраны все Cα атомы димера hAsp. Такой подход показал свою эффективность в описании способов передачи сигнала от аллостерического сайта к активному центру [132]. Рёбра графа определялись равновесными МД траекториями изучаемых систем. Для каждой пары Cα атомов по результатам 20 нс равновесной МД рассчитывалось абсолютное значение корреляции:

$$C_{ij} = \frac{\langle \Delta\overline{r_i}(t) \cdot \Delta\overline{r_j}(t) \rangle}{\left(\langle \Delta\overline{r_i}(t)^2 \rangle \langle \Delta\overline{r_j}(t)^2 \rangle \right)^{1/2}}$$

Рассчитанное значение затем подставлялось в функцию, преобразующую его в длину ребра:

$$d_{ij} = \log\left(\left|C_{ij}\right|\right)$$

В граф, описывающий динамику системы, вошли только рёбра, связывающие вершины, находившиеся на расстоянии не более 4,5 Å друг от друга на протяжении 75% длины траектории.

Использование взвешенных значений рёбер позволяет предложить возможные пути передачи сигнала между удалёнными областями белка, считая за наиболее вероятные те, что имеют наименьшую длину в пространстве графа. Общая длина сигнального пути в сетевом пространстве определяется суммой длин входящих в него рёбер. Оптимальные пути (optimal path – **OP**) передачи сигнала – наиболее короткие – были определены алгоритмом Флойда –Варшалла [133, 133] (рис. 39):

$$OP\ (i,j,k) = \min\big(OP(i,j,k-1), OP(i,k,k-1) + OP(k,j,k-1)\big),$$

где i, j – вершины между которыми производится поиск, k – счётчик вершин, принимающий значения от 0 до N – общего количества вершин.

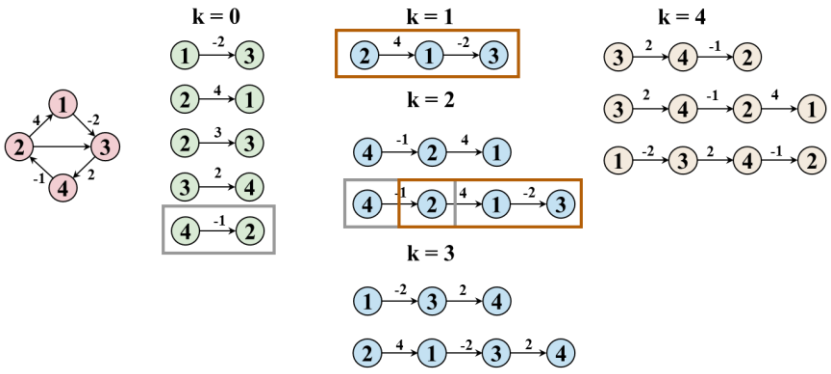


Рисунок 39. Схематическое представление алгоритма Флойда - Варшалла.

В графе динамики белка могут быть выделены отдельные кластеры (communities), характеризующиеся повышенной скоррелированностью движения и близким расположением входящих в них вершин. Передача сигнала между отдельными кластерами структуры происходит по особым главным вершинам (critical nodes), имеющим высокую степень вырожденности. Через главные вершины передаётся большой поток информации, поэтому они являются основной мишенью для аллостерического разрыва сигнала.

В данной работе кластеризация была осуществлена методом Джирвана – Ньюмена [135]. В процессе расчёта использует параметр сети *B* (betweenness) – количество путей, проходящих через данное ребро на пути от вершины *i* к вершине *j*. Алгоритм состоит из нескольких шагов:

1. Расчёт значения *B* для всех рёбер сети
2. Удаление ребра с наибольшей величиной *B*
3. Перерасчёт значений *B* для всех рёбер, связанных с удалённым
4. Повторение пунктов 2-3-4 до перебора всех рёбер системы.

Расчёт графов динамики белка был проведён в расширении NetworkAnalyser программного пакета VMD [136]. Анализ сетевой структуры был проведён в программном пакете Cytoscape3 [137].

Кластерный анализ графов апо-hAsp и hAsp:NAA(inh)

Графы систем апо-hAsp и hAsp:NAA(inh) были построены по равновесным траекториям систем длиною в 20 нс. В системе апо-hAsp было выделено 8 кластеров, 3 из которых объединяют вершины ASPA и ASPB, свидетельствуя о высокой степени скоррелированности движения двух субъединиц. На рис 40. представлено распределение по кластерам основных водородных связей между ASPA и ASPB и их заселённости в рассчитанных МД траекториях.

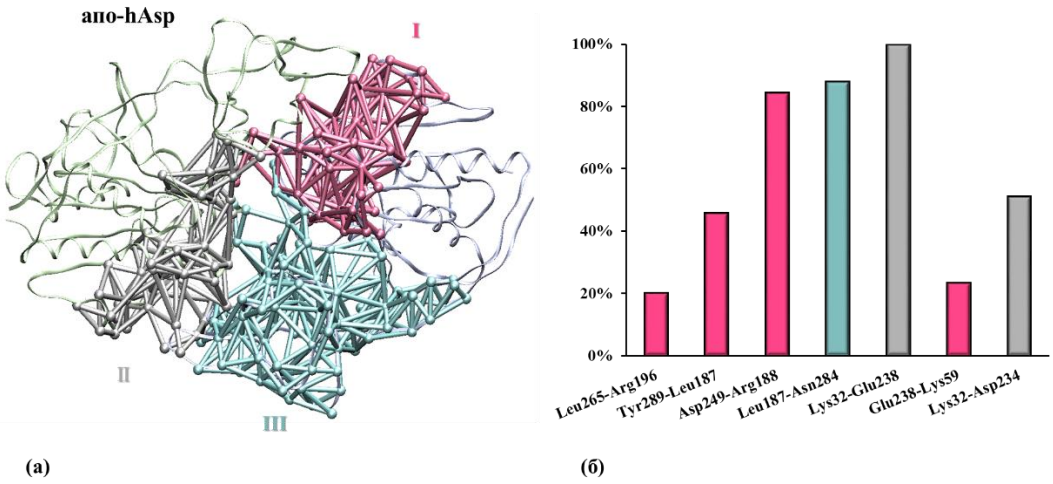


Рисунок 40. Кластеры апо-hAsp, содержащие одновременно вершины ASPA и ASPB (а). Заселённость водородных связей между ASPA и ASPB и их распределение по кластерам (б).

В hAsp:NAA(inh) количество кластеров понизилось до 7, что может быть следствием повышения взаимодействия в системе. Также 3 кластера объединяют вершины ASPA и ASPB, причём один из них принадлежит сайту аллостерического связывания NAA (рис. 41).

Разбиение динамического графа белка на кластеры должно отражать и его каталитические свойства. Так, в апо-hAsp два из трёх кластеров, расположенных между ASPA и ASPB, содержат также и аминокислоты активного сайта мономера A: Glu24, Glu178 и His116. Такое кластерное разбиение свидетельствует о повышенном влиянии взаимодействия между субъединицами на эти аминокислотные остатки.

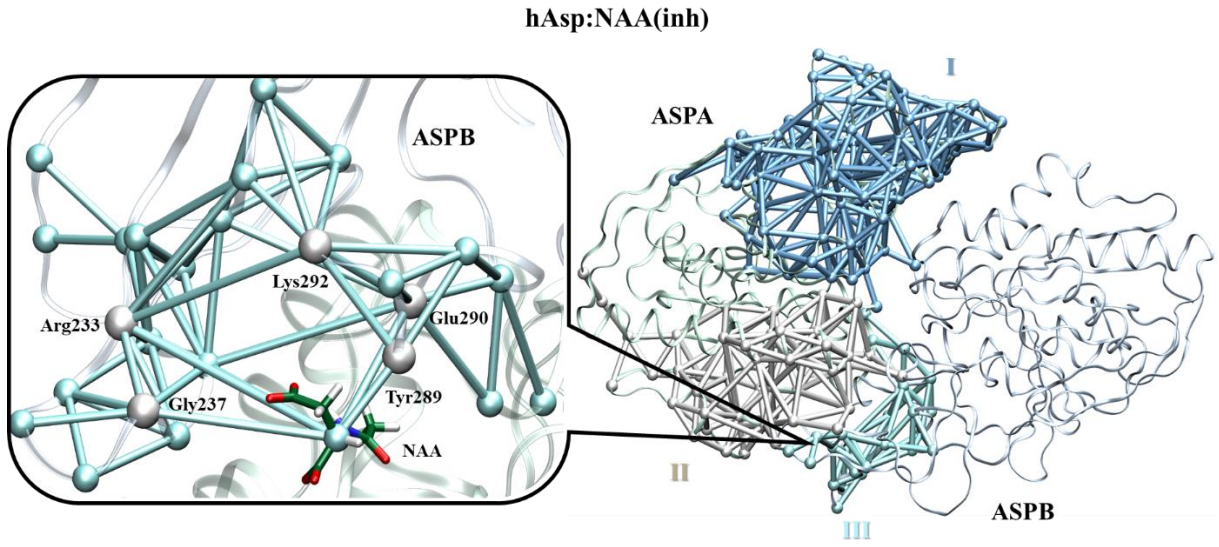


Рисунок 41. Кластеры hAsp:NAA(inh), содержащие одновременно вершины ASPA и ASPB. Расположение вершин аллостерического сайта на динамическом графе.

Анализ рёбер, образованных между ASPA и ASPB в обоих системах подтвердил результат, полученный на в результате анализа заселённости водородных связей и солевых мостиков. При связывании NAA в аллостерическом сайте ингибирования степень взаимодействия между двумя субъединицами повышается и происходит реорганизация невалентных взаимодействий между ASPA и ASPB. Из пяти главных вершин, общих для субъединиц, при связывании сохраняются только две Arg196 и Lys200.

Количество критических вершин в ASPA увеличивается в два раза (табл. 6), при этом их соотношение восстанавливается при удалении NAA.

Таблица 6. Количество главных вершин, образованных между ASPA и ASPB в изучаемых системах hAsp..

	апо-hAsp	hAsp:NAA(inh)	hAsp+NAA
ASPA	6	12	8
ASPB	7	7	7

Распределение аминокислот ворот активного сайта по кластерам также различаются в апо-hAsp и в системе с ингибитором. В апо-форме аминокислотные остатки 62-74 и 282-294 распределены между четырьмя кластерами, не имеющими общих главных вершин (рис. 42), что свидетельствует о пониженной взаимозависимости и о хаотичности их движения.

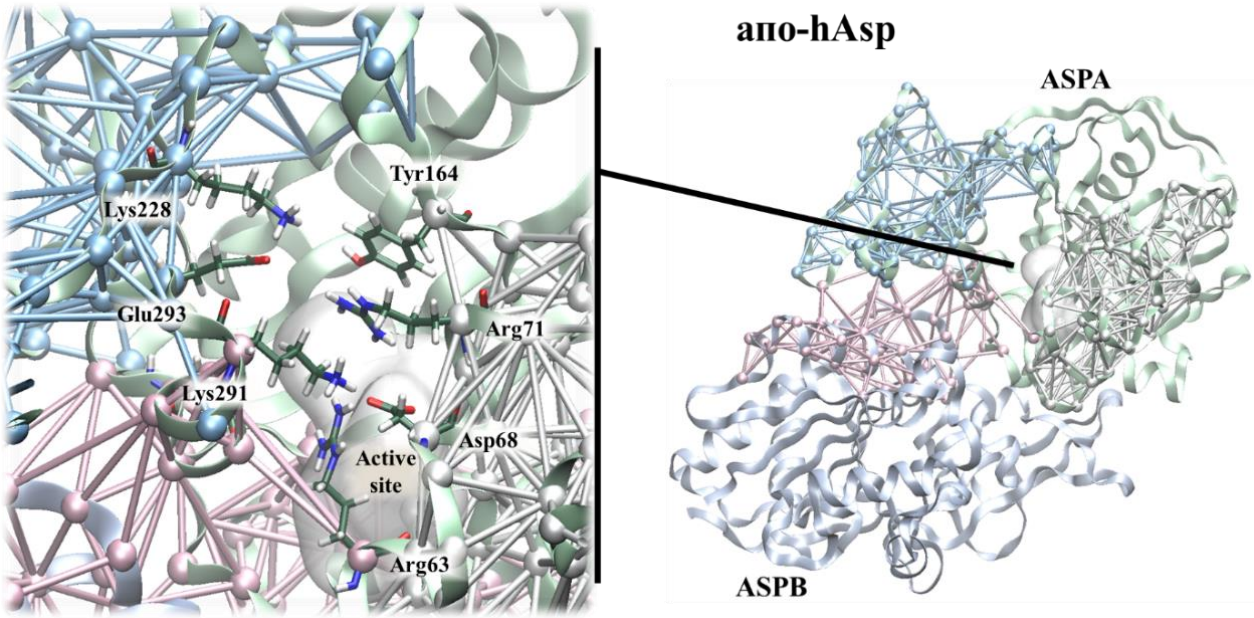


Рисунок 42. Кластерное разбиение вершин ворот транспортного канала ASPA апо-hAsp.

В то же время в системе с регулятором противоположные петли расположены в двух противолежащих кластерах, связанных двумя парами главных вершин (рис. 43).

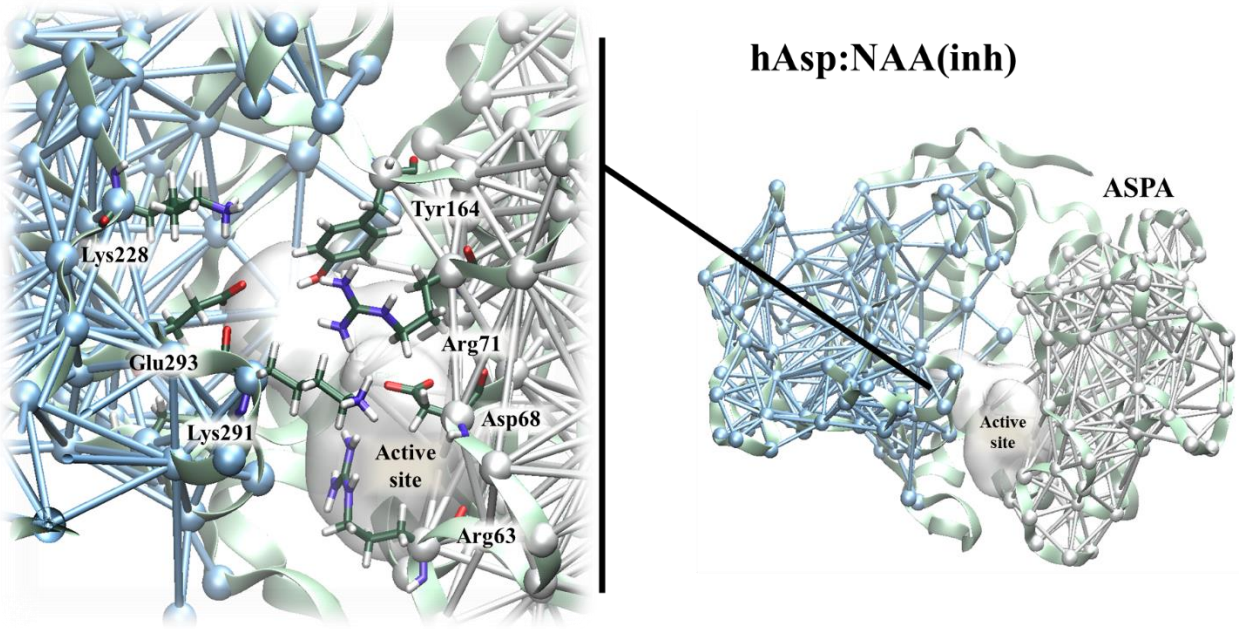


Рисунок 43. Кластерное разбиение вершин ворот транспортного канала ASPA hAsp:NAA(inh).

По результатам анализа главных вершин у ворот активного сайта ASPA были выделены основные направления движения соответствующих петель: в апо-форме главная вершина Arg63 связана ребром графа с главной вершиной Ala57, расположенной в противоположной стороне от петли 282-294. То есть движение основной цепи петли 62-74 направлено в сторону открытой конформации ворот (рис. 44а).

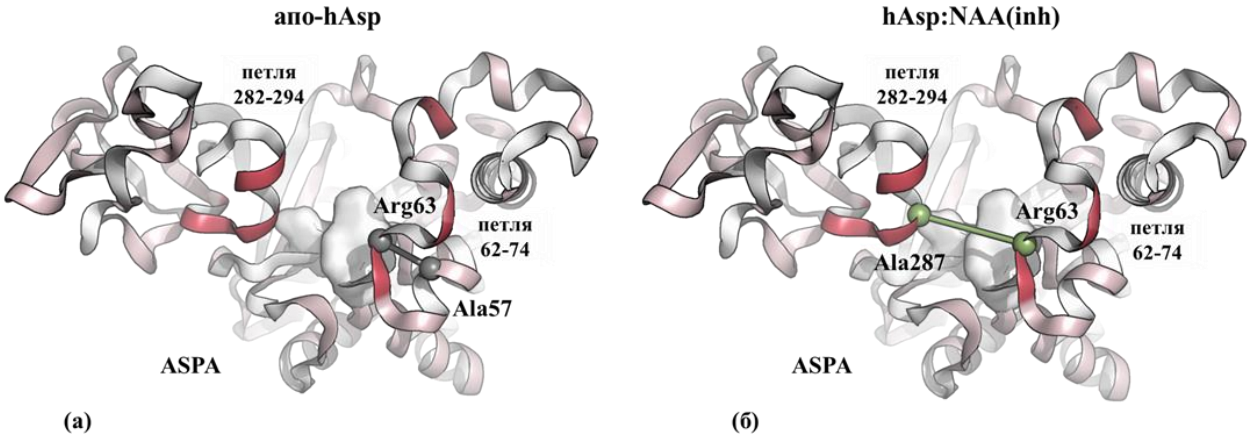


Рисунок 44. Главные вершины петель 62-74 и 282-294 в апо-hAsp (а) и в hAsp:NAA(inh) (б).

Тем временем в hAsp:NAA(inh) вершина Arg63 связана с главной вершиной Ala287, принадлежащей петле противоположной части ворот (рис. 44б) –

следовательно, в результате связывания движение петли 62-74 направлено в сторону закрытой конформации.

Пути передачи сигнала от аллостерического сайта к воротам активного центра

В полученных графах был проведён расчёт оптимальных путей передачи сигнала от вершины, ближайшей к NAA в сайте ингибирования (Tyr289 ASPB), до вершин ворот активного сайта ASPA (62-74 и 282-294). Все длины оптимальных путей значительно уменьшаются при связывании субстрата, а их количество возрастает (рис. 45а,б).

При этом диссоциация комплекса hAsp:NAA(inh) вызывает восстановление характеристик апо-формы. Возмущение структуры, вызванное связыванием в сайте ингибирования на внутренней поверхности ASPB по многочисленным расходящимся путям передаётся воротам активного центра ASPA и смещает равновесие в сторону закрытой формы.

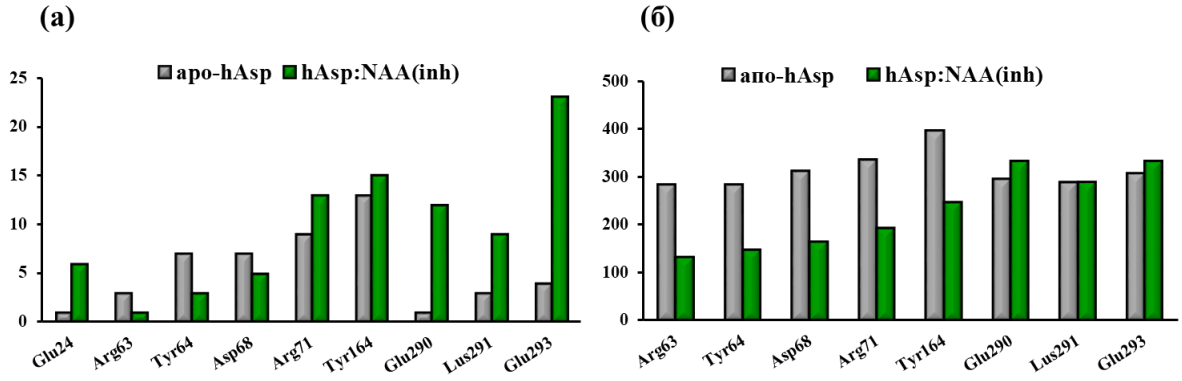


Рисунок 45. Количество сигнальных путей от ворот ASPA до Tyr289 (ASPB) (а) и их протяжённость (б) в системах апо-hAsp и hAsp:NAA(inh).

В заключении была рассчитана частота прохождения сигнальных путей через известные точечные клинические мутации hAsp в положениях 231, 285, 288 и 295. Положение наиболее распространённой мутации болезни Канаван (E285A) встречается в 10% сигнальных путей от аллостерического сайта ингибирования до ворот hAsp. Аминокислотные остатки Tyr231 и Tyr288 присутствуют в 20% путей.

Апробация предложенного механизма регуляции hAsp

Экспериментальные исследования [39] полиморфного варианта K213E аспартоацилазы были инициированы клиническими результатами [39], свидетельствующими о присутствии двойной мутации K213E/G274R у пациентов с болезнью Канаван. Несколько неожиданным результатом исследований *in vitro* было заключение, что единичная замена K213E не сказывается на каталитической активности hAsp. Анализ структурных особенностей димеров природного (wt-hAsp) и мутированного (K213E hAsp) фермента показывает, что замена K213E не должна влиять на химические преобразования в активном центре, поскольку позиция 213 расположена достаточно далеко от молекулярных групп, вовлеченных в процесс разрыва и образования химических связей при реакции гидролиза субстрата. Однако, динамические свойства фермента, ответственные за доступ субстрата в активный центр, могут быть модифицированы при замене положительно заряженного лизина в позиции 213 на отрицательно заряженный остаток глутамата.

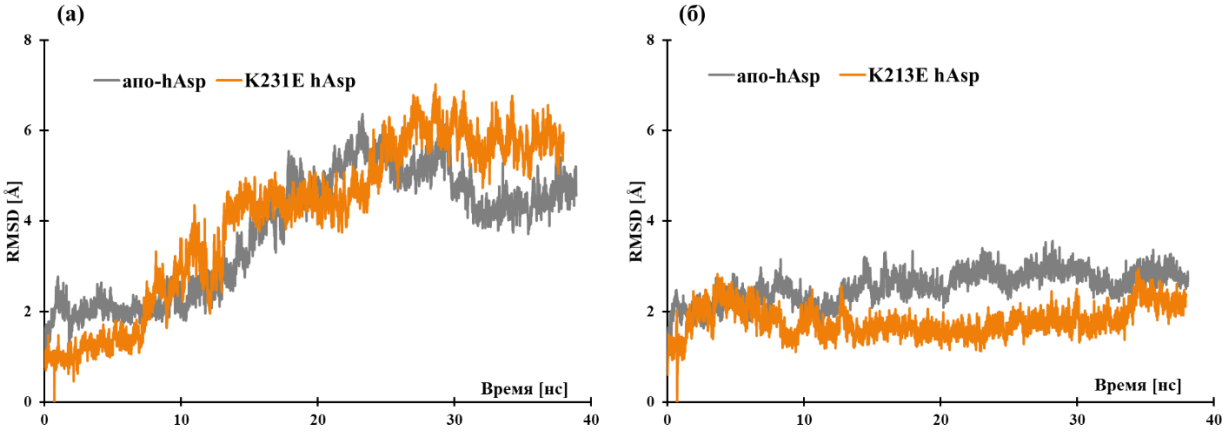


Рисунок 46. Среднеквадратичное отклонение ворот транспортного канала (Arg71, Tyr164, Lys228 и Glu293) в системе hAsp(K213E) для субъединиц ASPA (а) и ASPB (б).

На рис. 46 сопоставлены результаты расчетов МД траекторий для природного фермента и мутанта, где в качестве начальных условий использовались координаты соответствующих кристаллических структур PDB ID 2O53 и PDB ID 4MXU. Данные по среднеквадратичным отклонениям

(RMSD) для ключевых аминокислотных остатков Arg71, Glu293, Tyr64, Lys291, показывают, что в мономере ASPB ворота, контролирующие доступ субстрата в активный центр, закрыты, как и в кристалле. В мономере ASPA по мере удаления от структуры кристалла расстояние между петлями увеличивается, раскрывая ворота в активный центр.

Для настоящей работы важным заключением является то, что замена K213E не влияет на динамику пептидных цепей димерной молекулы hAsp, определяющих каталитическую активность фермента, что полностью согласуется с результатами эксперимента. Таким образом, модель регуляции каталитической активности аспартоацилазы за счет динамического сдвига конформаций димера получает дополнительную поддержку.

Глава 6. Аллостерический сайт активации hAsp

Предположение о наличии эффекта самоактивации в системе hAsp-NAA возникло благодаря сигмовидной форме начального отрезка кинетической кривой зависимости активности от концентрации субстрата [34].

Поиск аллостерического сайта активации

Изучение поверхности hAsp на наличие активирующего сайта связывания было проведено методами классической молекулярной динамики. По данным кинетического эксперимента, эффект самоактивации наблюдается уже при концентрациях субстрата от 20 мкМ, то есть сайт аллостерической активации должен обладать бо̀льшим сродством к субстрату, чем активный центр и протекать без стерических затруднений со стороны соседних аминокислотных остатков. Поэтому в присутствии нескольких молекул NAA в модельном растворе образование комплекса hAsp:NAA(act) должно происходить самопроизвольно. Для поиска сайтов активации было рассчитано 250 нс динамики димера hAsp с 15 молекулами NAA, помещёнными на расстояние не менее 15 Å от поверхности димера. Начальная геометрия hAsp соответствовала оптимизированной структуре, использованной в расчётах для апо-формы. По прошествии 2 нс динамики две молекулы NAA заняли структурно симметричные сайты из положительно заряженных Arg56, Lys59 и Lys60 на поверхности между ASPA и ASPB; заселённость этих сайтов составила 93% и 98% общей длины траектории для ASPA и ASPB соответственно.

Точное расположение молекул NAA в обнаруженных идентичных сайтах было локализовано методами молекулярного докинга в программных пакетах Autodock4.2 и FlexX (рис. 47), а оценённое сродство составило -6.5 ккал/моль.

Рассчитанные из энергий докинга константы диссоциации для hAsp:NAA(inh) и hAsp:NAA(act) отличаются в 17-20 раз, а следовательно связывание в обнаруженных сайтах предпочтительнее, чем в сайте

ингибирования, что соответствует экспериментальным данным о наличии эффекта активации при малых концентрациях NAA.

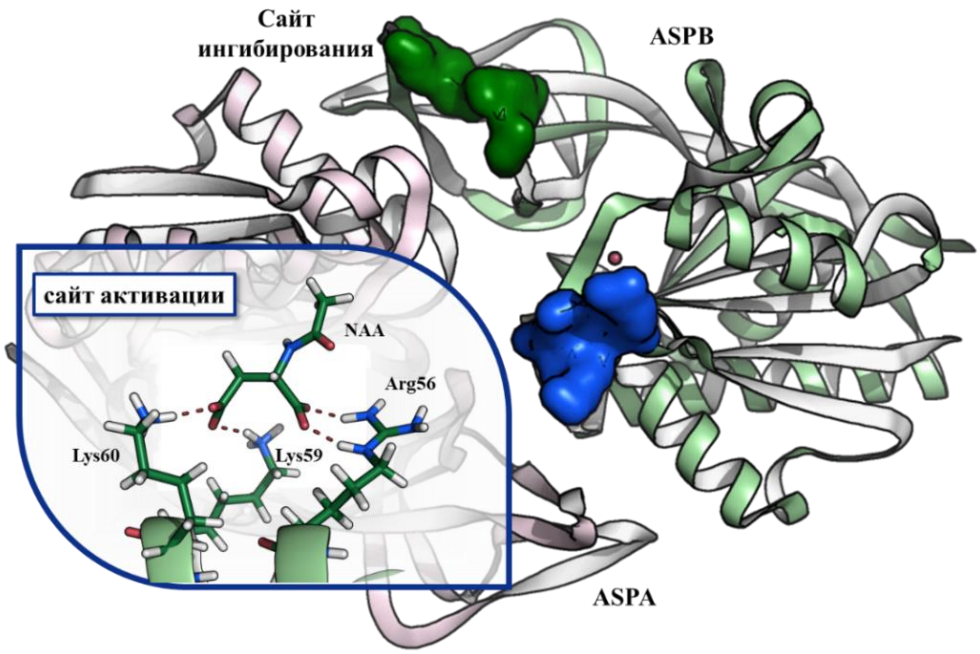


Рисунок 47. Положение потенциального сайта активации hAsp.

Предлагаемые аллостерические сайты находятся на поверхности белка и стабилизированы несколькими водородными взаимодействиями. Такое расположение не позволяет применить к ним методы расчёта свободной энергии более высокого порядка. В данной работе используются не абсолютные значения свободных энергий, а лишь их отношение, что может объяснить отличное соответствие расчётных данных экспериментальным величинам.

Молекулярно-динамическое исследование возможного динамического эффекта связывания в сайтах выявило наличие активационного эффекта: при связывании NAA в сайте на поверхности ASPB распределение расстояния между центрами масс петель 62-74 и 282-294, формирующих вход в активный сайт, сместилось в сторону бóльших значений, чем в апо-форме, при этом расположение ворот ASPB осталось неизменным (рис. 48).

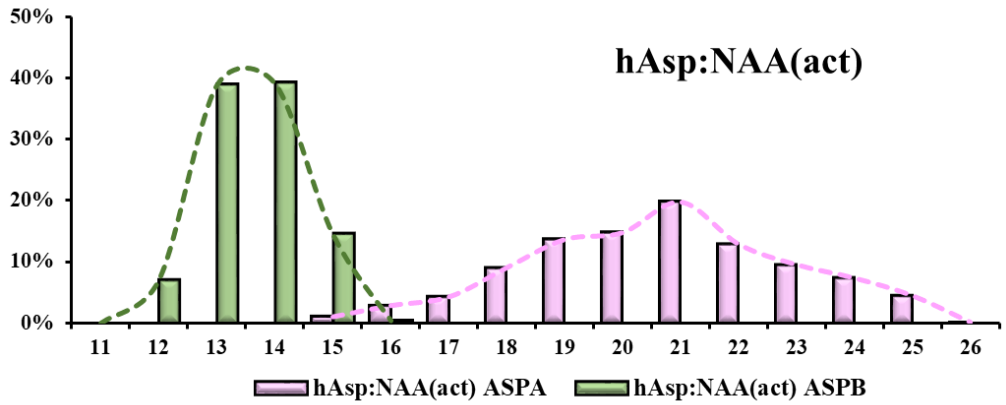


Рисунок 48. Распределение расстояния между центрами масс противоположный петель 62-74 и 282-294 hAsp:NAA(act).

Несмотря на связывание NAA в обоих структурно идентичных сайтах, эффект самоактивации вновь наблюдается лишь для активного центра ASPA. Анализ результатов сетевого анализа показал, что в динамическом графе hAsp:NAA(act) Lys60, принадлежащий сайту активации в ASPB, расположен на том же кластере, что и петля 282-294 единицы ASPA, а проходящее через него главное ребро Lys60 – Thr62 связывает их с аминокислотами сайта, что подтверждает гипотезу о передаче возмущения от сайта в ASPB воротам транспортного канала ASPA.

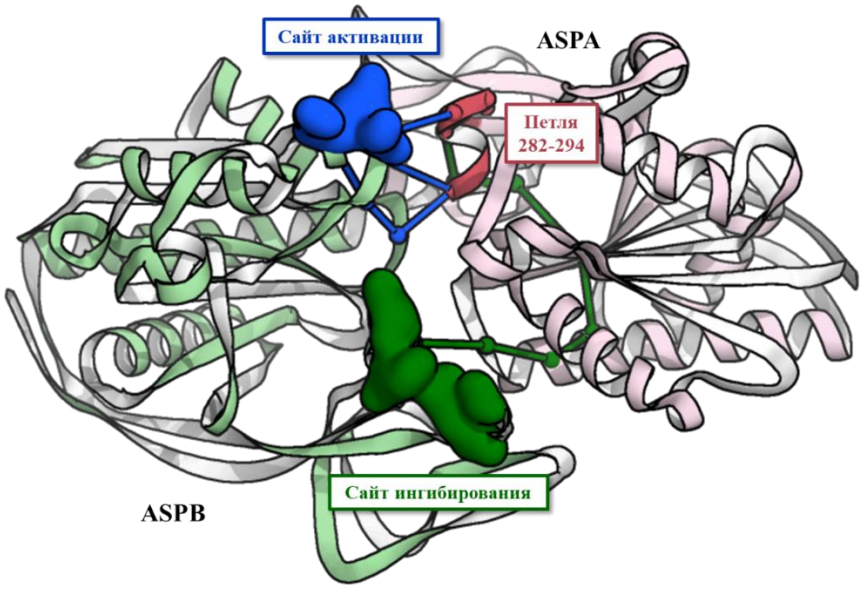


Рисунок 49. Наиболее заселённые пути передачи возмущения от аллостерических сайтов к воротам ASPA.

Сайт активации и сайт ингибирования расположены на поверхности между двумя субъединицами на расстоянии ~ 15 Å друг от друга. Близкое расположение сайтов аллостерической регуляции должно предполагать схожую природу передаваемого активному сайту сигнала, однако в исследуемой системе все полученные на предыдущих этапах результаты свидетельствуют об обратном. В результате описания наиболее заселённых путей передачи сигнала от вершин графа, соответствующих аллостерическим сайтам и их окружению, было показано, что ингибирующий и активирующий сигналы передаются по разным, непересекающимся маршрутам к вершинам ворот ASPA (рис. 49).

Глава 7. Кинетическая модель ферментативного гидролиза NAA

Полученные на предыдущих этапах данные о каталитической функции hAsp и о способах её регуляции были использованы для создания общей кинетической схемы ферментативного гидролиза NAA.

Модель состояний Маркова

Ансамбли состояний апо-hAsp, hAsp:NAA(inh) и hAsp:NAA(act), полученные на предыдущих этапах работы, включали по 500 тыс. кадров МД траектории в 500 нс для каждой системы. Рассчитанные траектории были применены для построения кинетической модели состояний Маркова (Markov State Model) [138].

Модель состояний Маркова (**МСМ**) – кинетическая модель, описывающая вероятность переходов между различными дискретными состояниями системы [139]. Эти состояния должны удовлетворять условию Маркова: т.е. вероятность перехода из текущего состояние в последующее не должна зависеть от предыдущих превращений в системе. Применение МСМ позволяет исследовать конформационные превращения, протекающие на временах, превышающих длины используемых траекторий. Сравнительно недавно подход МСМ стал применятся для описания конформационных переходов и поиска путей образования третичной структуры в белковых системах [140]. Однако применение мезоскопической модели Маркова-Фоккера-Планка, являющейся промежуточным случаем между МД подходом и классической МСМ, достаточно давно применяется для описания вращения протонной АТФ-синтазы [141].

МСМ является решением основного уравнения конформационной динамики:

$$Pr_i = r_i\lambda_i,$$

где P – матрица вероятностей переходов, r_i, λ_i –собственные вектора и собственные значения, описывающие сопутствующие структурные изменения и времена релаксации системы. P может быть рассчитано напрямую из МД траекторий, однако в таком случае полученные времена релаксации будут оценкой снизу. Для получения более точных значений требуется линейное преобразование координат.

Создание кинетической модели Маркова подразумевает три стадии преобразования исходных координат МД траекторий:

- переход к обобщённым координатам системы для уменьшения размерности исходной матрицы данных МД траекторий;
- линейное преобразование обобщённых координат для дальнейшего уменьшения размерности;
- дискретизация полученных состояний;
- расчёт матрицы вероятностей переходов между отдельными (дискретными) состояниями системы и оценка констант скорости соответствующих процессов.

Расчёт MCM проводился в двух системах обобщённых координат. В основном расчёте были выбраны Cα и Cβ атомы системы, во-первых, для уменьшения рассчитываемой матрицы состояний, а во-вторых, ввиду способности этих координат описывать как движения основной цепи белка, так и направление расположения боковых цепей. Вторая серия MCM была создана с использованием всех тяжёлых атомов аминокислот 62-74 и 282-294 в ASPA и ASPB.

Дальнейшее уменьшение размерности задачи необходимо ввиду неэффективности кластеризации больших массивов данных [142]. Метод линейного преобразования координат позволяет вычислить набор базисных векторов $U = \left[u_{1,\ldots,}u_m\right]$, где вектор u_i – обобщённая координата с m компонентами. Новые координаты задаются следующей проекцией:

$$y(t) = U^T x(t).$$

Обычно такая задача решается методом главных компонент [143, 144]. Данный метод решает задачу на собственные значения таким образом, что искомые подпространства максимизируют среднеквадратичное расстояние между точками. Таким образом в результате отбора в системе останутся состояния с наибольшим среднеквадратичным отклонением геометрии. Однако кинетическая постановка задачи не подразумевает поиск самых геометрически различных конформаций белка. Наибольший интерес представляет поиск наиболее медленных переходов между конформерами. Целью данного этапа должно стать выделение редких переходов. В данной работе линейное преобразование координат было осуществлено временным методом независимых компонент (**вМНК**) [145], выделяющим наиболее медленные переходы из общего массива данных. Метод использует вариационный подход конформационной динамики [146] и поэтому является наиболее удачным выбором для поиска редких конформационных переходов.

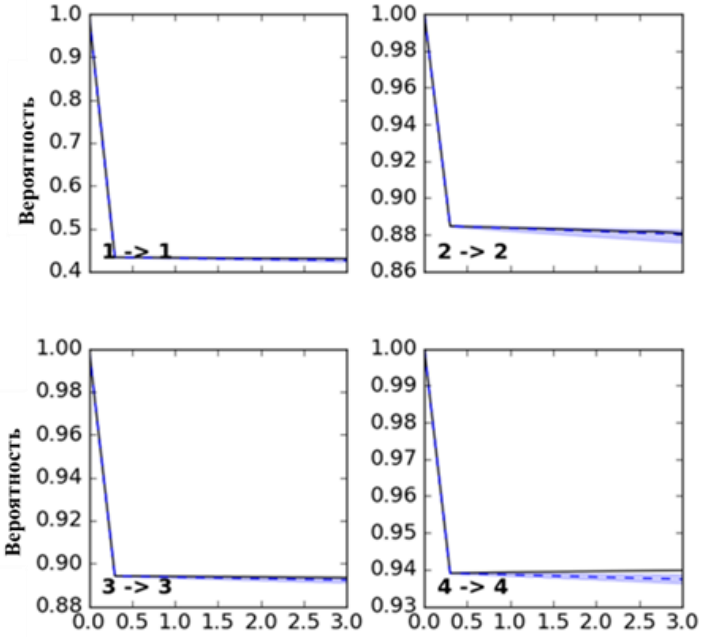


Рисунок 50. Результаты верификации кинетической модели по методу Колмогорова-Чапмена. Прерывистой линией показано рассчитанное по модели Маркова значение вероятности перехода, а непрерывная линия иллюстрирует зависимость, рассчитанную по исходным данным.

ММС требует дискретизации набора состояний. Несмотря на последовательное уменьшение размерности, объём преобразованных координат может быть велик. Наиболее удачным выбором алгоритма дискретизации пространства является метод Вороного [147], в котором создаётся набор k центров, все данные системы присваиваются ближайшему центру. В данной работе параметр k был принят равным 100. Расположение k-центров определялось методом k-средних [148].

Вслед за дискретизацией пространства рассчитывается матрица переходов между дискретными метосостояниями системы. Критически важен выбор времени задержки τ:

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

где t_i – время релаксации системы. Т должно быть выбрано так, чтобы значение t_i сохранялось для всех метосостояний. Выбор τ был проведён среди набора значений [1, 2, 3, 4, 5, 10, 20].

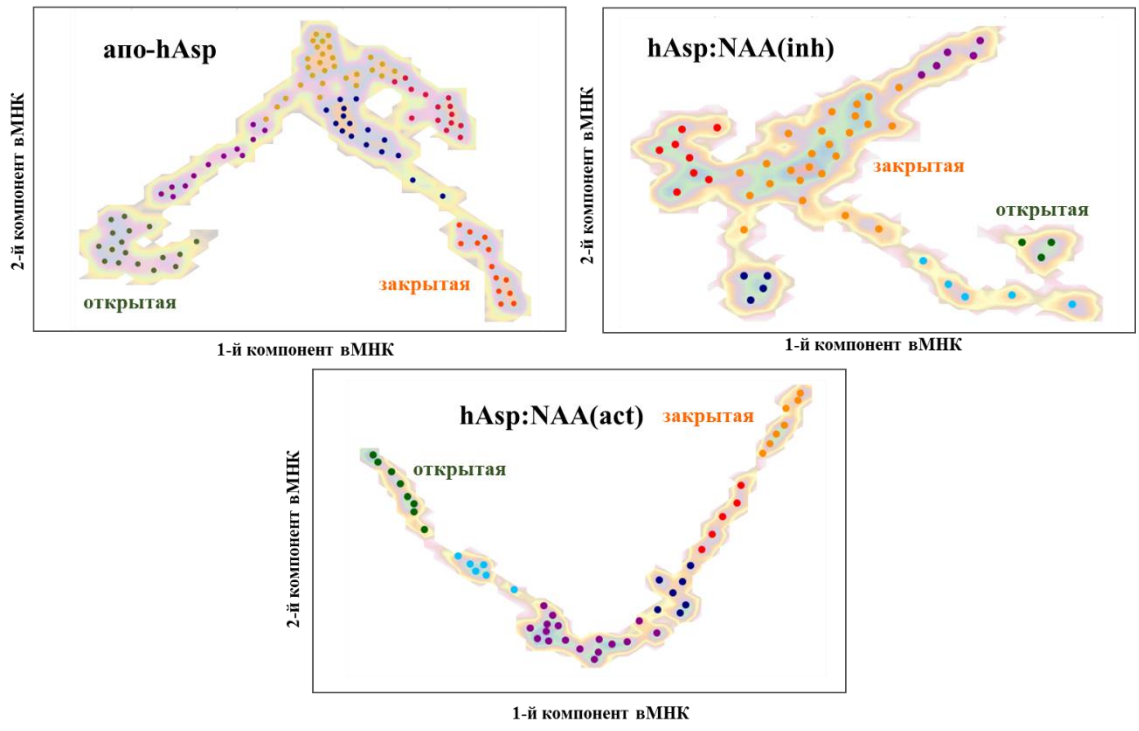


Рисунок 51. Проекция 6 макросостояний систем апо-hAsp, hAsp: NAA(inh) и hAsp: NAA(act) на две самые медленные компоненты вМНК.

Отклонение рассчитанной модели от исходного набора траекторий было оценено методом Колмогорова-Чапмена (рис. 50). Метосостояния были кластеризованы в 6 макросостояний по алгоритму Перрона [149] (рис. 51). Для этих состояний были восстановлены геометрии соответствующих конформаций и рассчитаны значения времён переходов между ними. По значениям среднего времени перехода были оценены константы прямых и обратных реакции конформационных превращений.

Расчёт МСМ был осуществлён в программном пакете PyEMMA 2 [150]. Независимым образом были определены наиболее медленные переходы систем hAsp. Во всех МСМ для апо-hAsp, hAsp:NAA(inh) и hAsp:NAA(act) самой медленной проекции вМНК оказался переход между открытой и закрытой формами ворот ASPA (рис. 52).

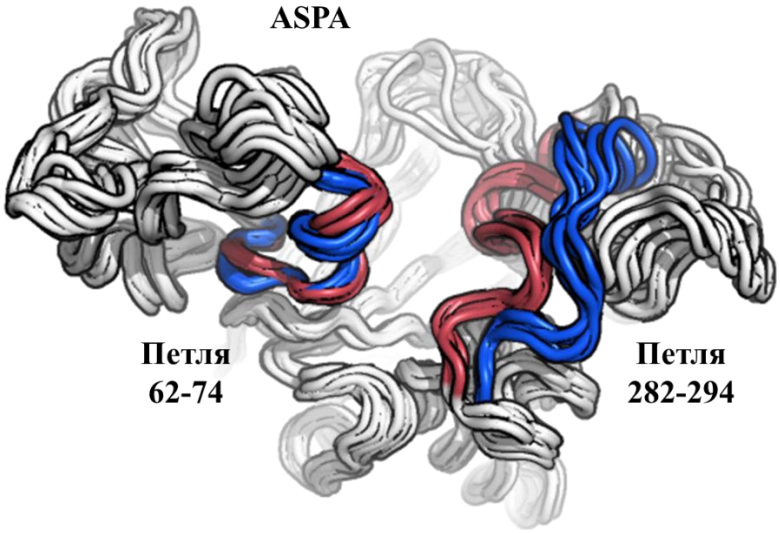


Рисунок 52.Макросостояния МСМ, переход между которыми является самым медленным.

При этом ворота ASPB оставались закрытыми во всех системах и во всех макросостояниях модели hAsp. Конечно, конформация, соответствующая димеру hAsp с открытыми воротами обеих субъединиц существует, однако полученные данные позволяют предположить, что заселённость этой конформации крайне мала и не оказывает существенного влияния на каталитические свойства фермента.

Из рассчитанных прямых и обратных констант скорости для равновесия между закрытой (k_c) и открытой (k_o) конформациями ворот ASPA были оценены константы равновесия для систем апо-hAsp, hAsp:NAA(inh), hAsp:NAA(act) (табл. 7).

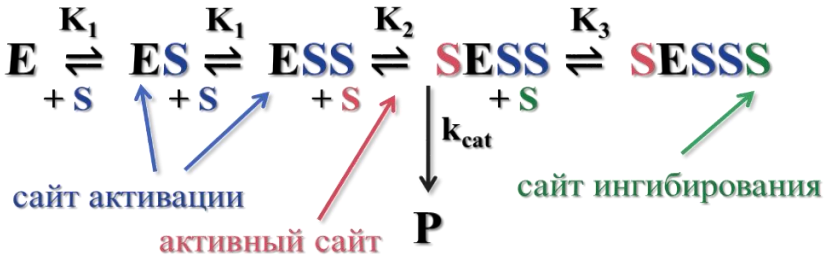
Таблица 7. Кинетические константы конформационных переходов, оценённые в MCM.

	$k_o, \text{с}^{-1}$	$k_c, \text{с}^{-1}$	K
апо-hAsp	$6{,}7 \times 10^6$	$6{,}1 \times 10^6$	1,1
hAsp:NAA(inh)	$1{,}0 \times 10^7$	$5{,}0 \times 10^5$	20
hAsp:NAA(act)	$6{,}3 \times 10^7$	$1{,}1 \times 10^9$	0,06

Полученные результаты позволяют полуколичественно описать конформационную динамику системы. В апо-форме конформации открытых и закрытых ворот ASPA равновероятны и относятся как 1:1. Связывание NAA в сайт активации вызывает смещение равновесия в сторону открытой формы. А последующее связывание в сайте ингибирования, наоборот стабилизирует закрытую конформацию ворот ASPA.

Кинетическая модель hAsp

Результаты, полученные в данной работе, могут быть использованы для создания кинетической модели каталитической функции hAsp:



Каждая стадия предлагаемой схемы была принята равновесной. Константа K_1описывает связывание NAA в сайты активации, K_2 – связывание в активном сайте, а K_3 относится к связыванию в сайте ингибирования. Аналитическое

выражение для наблюдаемой скорости реакции может быть получено следующим образом:

$$K_1 = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{[ES][S]}{[ESS]}, K_2 = \frac{[ESS][S]}{[SESS]},$$

$$K_3 = \frac{[SESS][S]}{[SESSS]}$$

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [ESS] + [SESS] + [SESSS]$$

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k_{cat}[SESS] = \frac{k_{cat}[E]_0[S]^3}{K_2[S]^2 + K_1K_2[S] + K_1^2K_2 + \frac{[S]^4}{K_3}}$$

$$V = \frac{V_{max}[S]^3}{K_2[S]^2 + K_1K_2[S] + K_1^2K_2 + \frac{[S]^4}{K_3}}$$

Третья степень концентрации субстрата в числителе обеспечивает s-образную форму кинетической кривой на начальном участке, тогда как четвёртая степень в знаменателе отвечает за понижение активности при повышенных концентрациях NAA. Для прямого сравнения расчётных данных и результатов эксперимента, точки, полученные в [34] были наложены на кинетическую кривую, полученную в данной работе (рис. 53).

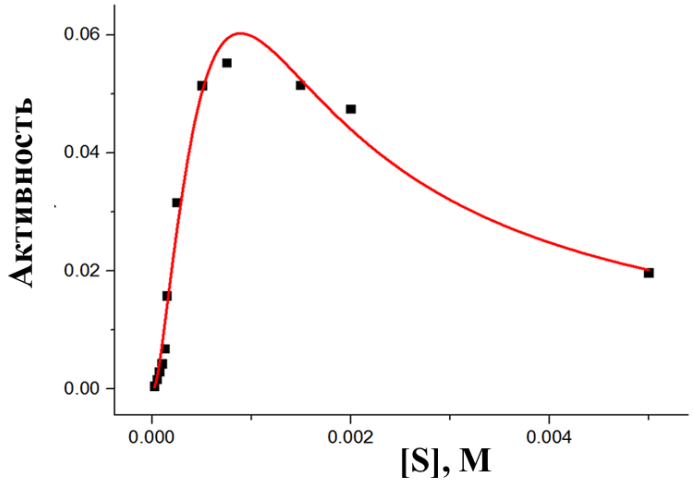


Рисунок 53. Сравнение рассчитанной кинетической кривой (красная линия) с экспериментальными данными (чёрные точки) [34].

Стоит отметить, что предлагаемая модель описывает основной путь катализа, не отрицая возможность существования других, неучтённых процессов в данной системе. Например, NAA может связаться в сайте ингибирования в системе E, ES или ESS и т.п. Однако, благодаря прекрасному соответствию расчётной кривой и литературных данных можно считать, что именно описанные процессы определяют наблюдаемую кинетику hAsp.

Таблица 8. Значения констант равновесия стадий кинетической схемы, рассчитанных по экспериментальным данным и по предлагаемой кинетической модели.

Эксперимент	Теория	
$K_1 = 6{,}4 \cdot 10^{-5}$M $\Delta G_{\text{св}}° = -5{,}8$ ккал/моль	$K_1 = 2{,}0 \cdot 10^{-5}$M $\Delta G_{\text{св}}° = -6{,}5$ ккал/моль	
$K_2 = 4{,}5 \cdot 10^{-4}$M $\Delta G_{\text{св}}° = -4{,}6$ ккал/моль	-	
	Autodock4	FlexX
$K_3 = 1{,}5 \cdot 10^{-3}$M $\Delta G_{\text{св}}° = -3{,}9$ ккал/моль	$K_3 = 4{,}1 \cdot 10^{-4}$M $\Delta G_{\text{св}}° = -4{,}7$ ккал/моль	$K_3 = 3{,}4 \cdot 10^{-4}$M $\Delta G_{\text{св}}° = -4{,}8$ ккал/моль

Полученные значения стандартной свободной энергии докинга для сайтов активации и ингибирования позволяют оценить константы связывания этих процессов (табл. 8).

Оценка энергии докинга NAA в активном сайте проведена не была, так как данный метод не способен учесть влияние иона цинка, находящегося в активном сайте и вносящего существенный вклад в стабилизацию ES. Отношение расчётных констант связывания в активационном сайте и в сайте ингибирования составило 17-20 (в зависимости от выбранного значения для K3), что соответствует экспериментальному значению 23 для K_3/K_1.

Выводы

1. По результатам расчёта профиля свободной энергии для полного каталитического цикла фермента центральной нервной системы человека hAsp сделан вывод, что вклад в эффективную каталитическую константу гидролиза субстрата (N-ацетил-L-аспартата) определяется элементарными стадиями нуклеофильной атаки каталитической молекулы воды и выхода ацетат-аниона в раствор.
2. Субъединицы гомодимера hAsp имеют неидентичные каталитические свойства вследствие понижения симметрии четвертичной структуры в динамике белка по сравнению со структурой кристалла.
3. Взаимодействие между двумя химически идентичными мономерами hAsp влияет на равновесие между активной (открытой для субстрата) и неактивной (закрытой) формами одного из мономеров.
4. Аллостерическое воздействие N-ацетил-L-аспартата на структурно идентичные участки субъединиц вызывает различный отклик в области входа в транспортный канал фермента.
5. Связывание в обнаруженных сайтах ингибирования и активации N-ацетил-L-аспартата смещает равновесие между открытой и закрытой формами hAsp.
6. Предлагаемая кинетическая схема, описывающая hAsp как систему с одним активным центром, двумя сайтами активации и одним сайтом ингибирования, полностью воспроизводит кинетические эксперименты.
7. Результаты, полученные для других ферментов человека - ацетилхолинэстеразы, ферментов зрительной системы Arl3·RP2 и ферментов сигнальной системы Ras·GAP, демонстрируют применимость использованных методов компьютерного моделирования свойств ферментов.

Литература

1. Kots E. D., Khrenova M. G., Lushchekina S. V., Nemukhin A. V., Varfolomeev S. D.. Modeling the complete catalytic cycle of aspartoacylase // J. Phys. Chem. B. – 2016. – V. 120. – P. 4221-4231.
2. Khrenova M. G., Kots E. D., Nemukhin A. V. Reaction mechanism of the guanosine triphosphate hydrolysis by the vision-related protein complex arl3-rp2 // J. Phys. Chem. B. – 2016. – V. 120. – P. 3873-3879.
3. Хренова М. Г., Коц Е. Д., Кулакова А. М., Поляков И. В. Моделирование реакции гидролиза гуанозинтрифосфата белковом комплексе ras gap // Вест. Моск. Ун-та. сер. 2, химия – 2016. – Т. 57. – С. 7-10.
4. Lushchekina S.V., Kots E.D., Novichkova D.A., Petrov K.A., Masson P. Role of Acetylcholinesterase in β-Amyloid Aggregation Studied by Accelerated Molecular Dynamics // BioNanoScience. – 2017. – V. 7, no. 2. – P. 396-402.
5. Kharlamova A. D., Lushchekina S. V., Petrov K. A., Kots E. D., Nachon F., Villard-Wandhammer M., Zueva I. V., Krejci E., Reznik V. S., Zobov V. V., Nikolsky E. E., Masson P. Slow-binding inhibition of acetylcholinesterase by a 6-methyluracil alkyl-ammonium derivative: mechanism and advantages for myasthenia gravis treatment // Biochem. J. – 2016. – V. 473. – P. 1225-1236.
6. Варфоломеев С.Д., Лущекина С.В., Немухин А.В., Кулакова А.М., Коц Е.Д., Махаева Г.Ф., Делакур Э., Локридж О., Массон П. Молекулярный полиморфизм ферментов человека — основа индивидуальной чувствительности к лекарствам. Суперкомпьютерное моделирование как метод анализа структурных изменений белка и его каталитической активности // Изв. Акад. Наук, сер. хим. – 2016. – Т. 6. – С. 1592-1607.
7. Lushchekina S. V., Kots E. D., Kharlamova A. D., Petrov K. A., Masson P. Molecular modeling of mechanism of action of anti-myasthenia gravis slow-binding inhibitor of acetylcholiesterase // International Journal of Risk and Safety in Medicine. – 2015. – V. 27. – P. 74-75.

8. Semenov V. E., Giniyatullin R. K., Lushchekina S. V., Kots E. D., Petrov K. A., Nikitashina A. D., Minnekhanova O. A., Zobov V. V., Nikolsky E. E., Masson P., Reznik V. V. Macrocyclic derivatives of 6-methyluracil as ligands of the peripheral anionic site of acetylcholinesterase // MedChemComm. – 2014. – V. 5. – P. 1729-1735.
9. Kots E. D., Lushchekina S. V., Varfolomeev S. D., Nemukhin A. V. Role of the Protein Dimeric Interface in Allosteric Inhibition of N-Acetyl-Aspartate Hydrolysis by Human Aspartoacylase // J. Chem. Inf. Model. . – 2017. – V. 57. – P. 1999 – 2008.
10. Khrenova M. G., Kots E. D., Varfolomeev S. D., Lushchekina S. V., Nemukhin A. V. Three Faces of N-Acetylaspartate: Activator, Substrate and Inhibitor of Human Aspartoacylase // J. Phys. Chem. B. – 2017. – V. 121. – P. 9389-9397.
11. Varfolomeev S.D., Kots E.D., Khrenova M.G., Lushchekina S.V., Nemukhin A.V. Supercomputer Technologies for Structural-Kinetic Study of Mechanisms of Enzyme Catalysis: A Quantum-Chemical Description of Aspartoacylase Catalysis // Doklady Physical Chemistry. – 2017. – V. 474. – P. 444-447.
12. Madhavarao C. N., Chinopoulos C., Chandrasekaran K., Namboodiri M. A. Characterization of the N-acetylaspartate biosynthetic enzyme from rat brain // J. Neurochem. – 2003. – V. 86. – P. 824–835.
13. Huang W., Wang H., Kekuda R., Fei Y. J., Friedrich A., Wang J., Conway S. J., Cameron R. S., Leibach F. H., Ganapathy V. Transport of N-Acetylaspartate by the Na+-Dependent High-Affinity Dicarboxylate Transporter NaDC3 and Its Relevance to the Expression of the Transporter in the Brain // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2000. – V. 295. P. 392–403.
14. Baslow M. H. N-acetylaspartate in the vertebrate brain: metabolism and function // Neurochem. Res. – 2003. – V. 28. – P. 941 – 953.
15. Tallan H. H., Moore S. Stein W. H. N-Acetyl-l-aspartic acid in brain // J. Biol. Chem. – 1956. – V. 219. – P. 257–264.

16. Tallan H. H. Studies on the distribution of N-acetyl-l-asparticacid in brain // J. Biol. Chem. – 1957. – V. 224. – P. 41–45.
17. Simmons M. D., Frondoza C. G., Coyle J. T. Immunocytochemical localization of N-acetylaspartate with monoclonal antibodies // Neurosci. – 1991. – V. 45. – P. 37–45.
18. Prokesch A., Pelzmann H. J., Pessentheiner A. R., Huber K., Madreiter-Sokolowski C. T., Drougard A., Schittmayer M., Kolb D., Magnes C., Trausinger G., Graier W. F., Birner-Gruenberger R., Pospisilik J. A., Bogner-Strauss J. G. N-acetylaspartate catabolism determines cytosolic acetyl-CoA levels and histone acetylation in brown adipocytes // Sci. Rep. – 2016. – V. 6. DOI: 10.1038/srep23723
19. Zand B., Previs R. A., Zacharias N. M., Rupaomoole R., Mitamura T., Nagaraja A. S., Giundani M., Dalton H. J., Yang L., Achreja J. B. A., Hu W., Pecot C. V., Ivan C., Wu S. Y., McCullough C. R., Gharpure K. M., Shoshan E., Pradeep S., Mangala L. S., Rodriguez-Aguayo C., Wang Y., Nick A. M., Davies M. A., Armaiz-Pena G., Liu J., Lutgendorf S. K., Baggerly K. A., Eli M. B., Lopez-Berestein G., Nagrath D., Bhattacharya P. K., Sood A. K. Role of Increased n-acetylaspartate Levels in Cancer // J. Natl. Cancer Inst. – 2016. – V. 108. – djv426.
20. Baslow M. H. Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology // Springer Science. 2007. 619 p.
21. Baslow M. H. Evidence supporting a role for N-acetyl-L-aspartate as a molecular water pump in myelinated neurons in the central nervous system. An analytical review // Neurochem. Int. – 2002. – V. 40. – P. 295–300.
22. Francis J. S., Strande L., Markov V., Leone P. Aspartoacylase supports oxidative energy metabolism during myelination // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2012. – V. 32. – P. 1725–1736.
23. Chakraborty G., Mekala P., Yahya D., Wu G., Ledeen R. W. Intraneuronal N-acetylaspartate supplies acetyl groups for myelin lipid synthesis: evidence for

myelin-associated aspartoacylase // J. Neurochem. – 2001. – V. 78. – P. 736–745.

24. Matalon R., Rady P. L., Platt K. A., Skinner H. B., Quast M. J., Campbell G. A., Matalon K., Ceci J. D., Tyring S. K., Nehls M., Surendran S., Wei J. Ezell E. L., Szucs S. Knock-out mouse for Canavan disease: a model for gene transfer to the central nervous system // J. Gene Med. – 2000. – V. 2. – P. 165–175.
25. Richards T. L. Proton MR spectroscopy in multiple sclerosis: Value in establishing diagnosis, monitoring progression, and evaluating therapy // Am. J. Neuroradiol. – 1991. – V. 157. – P. 1073-1078.
26. Klunk W. E., Moossy J., McClure R. J., Pettegrew J. W. N-acetyl-L-aspartate and other amino acid metabolites in Alzheimer's disease brain // Neurology. – 1992. – V. 42. – P. 1578-1585.
27. Hugg J. W., Laxer K. D., Matson G. B., Maudsley A. A., Weiner M. W. Neuron loss localizes human temporal lobe epilepsy by in vivo proton magnetic resonance spectroscopic imaging // Ann. Neurol. – 1993. – V. 34. – P. 788–794.
28. Matalon, R., Michals-Matalon, K., Sebesta, M., Deanching, M., Gashkoff, P., Casanova, J. Aspartoacylase deficiency and N-acetylaspartic aciduria in patients with Canavan disease // Am. J. Med. Genet. – 1988. – V. 29. – P. 463–471.
29. The Human Gene Mutation Database: http://www.hgmd.org
30. Protein Data Bank: http://pdb.rcsb.org
31. Le Coq J., Pavlovsky A., Malik, R., Sanishvili R., Xu C., Viola R. E. Examination of the mechanism of human brain aspartoacylase through the binding of an intermediate analogue // Biochem. – 2008. – V. 47. – P. 3484–3492.
32. Bitto E., Bingman C. A., Wesenberg G. E., McCoy J. G., Phillips Jr. N. Structure of aspartoacylase, the brain enzyme impaired in Canavan disease // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2007. – V. 104. – P. 456–461.

33. Levin E. J., Kondrashov D. A., Wesenberg G. E., Phillips Jr. G. N. Ensemble refinement of protein crystal structures: validation and application // Structure. – 2007. – V. 15. – P. 1040-1052.
34. Le Coq J., An H. J., Lebrilla C., Viola R. E. Characterization of Human Aspartoacylase: The Brain Enzyme Responsible for Canavan Disease // Biochem. – 2006. – V. 45. – P. 5878–5884.
35. Moore R. A., Le Coq J., Faehnle C. R., Viola R. E. Purification and preliminary characterization of brain aspartoacylase // Arch. Biochem. Biophys. – 2003. – V. 413. – P. 1-8.
36. Pearl F. M., Bennett C. F., Bray J. E., Harrison A. P., Martin N., Shepherd A., Sillitoe I., Thornton J., Orengo C. A. The CATH database: an extended protein family resource for structural and functional genomics // Nucleic Acids Res. – 2003. – V. 31. – P. 452–455.
37. Madej T., Gibrat J. F., Bryant S. H. Threading a database of protein cores // Proteins. – 1995. – V. 23. – P. 356–369.
38. Madhavarao, C. N., Hammer, J. A., Quarles, R. H., Namboodiri, M. A. A radiometric assay for aspartoacylase activity in cultured oligodendrocytes // Anal. Biochem. – 2002. - V. 308. - P. 314-319.
39. Hershfield J. R., Pattabiraman N., Madhavarao C. N., Namboodiri M. A. Mutational analysis of aspartoacylase: implications for Canavan disease // Brain Res. – 2007. – V. 1148. – P. 1-14.
40. Makarova K. S., Grishin N. V. The Zn-peptidase superfamily: functional convergence after evolutionary divergence // J. Mol. Biol. – 1999. – V. 292. – P. 11-17.
41. Zhang C., Gao J. Y., Chen Z., Xue Y. Molecular dynamics and density functional theory studies of substrate binding and catalysis of human brain aspartoacylase // J. Mol. Graph. Model. – 2010. – V. 28. – P. 799–806.
42. Herga S., Berrin J. G., Perrier J., Puigserver A., Giardina T. Identification of the zinc binding ligands and the catalytic residue in human aspartoacylase, an

enzyme involved in Canavan disease // FEBS Lett. – 2006. – V. 580. – P. 5899-5904.

43. Wijayasinghe Y. S., Pavlovsky A. G., Viola R. E. Aspartoacylase catalytic deficiency as the cause of Canavan disease: a structural perspective // Biochem. – 2014. – V. 53. – P. 4970-4978.

44. Tacke, U., Olbrich, H., Sass, J. O., Fekete, A., Horvath, J., Ziyeh, S., Kleijer, W. J., Rolland, M. O., Fisher, S., Payne, S., Vargiami, E., Zafeiriou, D. I., Omran, H. Possible genotype-phenotype correlations in children with mild clinical course of Canavan disease // Neuropediatrics. – 2005. – V. 36. – P. 252−255.

45. Rady, P. L., Vargas, T., Tyring, S. K., Matalon, R., Langenbeck, U. Novel missense mutation (Y231C) in a Turkish patient with canavan disease // Am. J. Med. Genet. – 1999. – V. 87. – P. 273−275.

46. Zhang C., Gao J. Y., Chen Z., Xue Y. Molecular dynamics and density functional theory studies of substrate binding and catalysis of human brain aspartoacylase // J. Mol. Graph. Model. – 2010. – V. 28. – P. 799–806.

47. MacKerell Jr. A. D., Bashford D., Bellott M., Dunbrack Jr. R. L., Evanseck J. D., Field M. J., Fischer S., Gao J., Guo H., Ha S., Joseph-McCarthy D., Kuchnir L., Kuczera K., Lau F. T. K., Mattos C., Michnick S., Ngo T., Nguyen D. T., Prodhom B., Reiher III W. E., Roux B., Schlenkrich M., Smith J.C., Stote R., Straub J., Watanabe M., Wiorkiewicz-Kuczera J., Yin D., Karplus M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins // J. Phys. Chem. B. – 1998. – V. 102. – P. 3586–3616.

48. Zhang C., Liu X., Xue Y. A General Acid-General Base Reaction Mechanism for Human Brain Aspartoacylase: A QM/MM Study // Comput. Theor. Chem. – 2012. – V. 980. – P. 85−91.

49. Torrie G. M., Valleau J. P. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free energy estimation: umbrella sampling // J. Comput. Phys. – 1977. – V. 23. – P.187–199.

50. Kumar S., Bouzida D., Swendsen R. H., Kollman P. A., Rosenberg J. M. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method // J. Comput. Chem. – 1992. – V. 13. – P. 1011–1021.
51. Vasilevskaya T., Khrenova M.G., Nemukhin A.V., Thiel W. Reaction mechanism of matrix metalloproteinases with a catalytically active zinc ion studied by the QM(DFTB)/MM simulations // Mend. Comm. – 2016. – V. 26. – P. 209-211.
52. Perdew J. P., Burke K., Ernzerhof M. Generalized gradient approximation made simple // Phys. Rev. Lett. – 1996. – V. 77. – P. 3865−3868.
53. Adamo C., Barone V. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: the PBE0 model // J. Chem. Phys. – 1999. – V. 110. – P. 6158-6170.
54. Duan Y., Wu C., Chowdhury S., Lee M. C., Xiong G., Zhang W., Yang R., Cieplak P., Luo R., Lee T., Caldwell J., Wang J., Kollman P. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations // J. Comput. Chem. – 2003. – V. 24. – P. 1999 – 2012.
55. Wang J., Cieplak P., Kollman P. A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? // J. Comput. Chem. – 2000. – V. 21. – P. 1049−1074.
56. Warshel A., Levitt M. Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme // J. Mol. Biol. – 1976. – V. 103. – P. 227−249.
57. Senn H. M., Thiel W. QM/MM methods for biomolecular systems // Angew. Chem. Int. Ed. – 2009. – V. 48. – P. 1198-229.
58. Merz K. M. Jr. Using Quantum Mechanical Approaches to Study Biological Systems // Acc. Chem. Res. – 2014. – V. 47. – P. 2804-2811.

59. van der Kamp M. V., Mulholland A. J. Combined quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) methods in computational enzymology // Biochem. – 2013. – V. 52. – P. 2708-2728.
60. Monticelli L., Salonen E. Biomolecular Simulations: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology // Springer Science+Business Media. 2013. 657 p.
61. Murphy R. B., Phillip D. M., Friesner R. A. A Mixed quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) method for large-scale modeling of chemistry in protein environments // J. Comput. Chem. – 2000. – V. 21. – P. 1442-1457.
62. Vorobyov I., Anisimov V. M., Greene S., Venable R. M., Moser A., Pastor R. W., and MacKerell Jr. A. D. Additive and classical drude polarizable force fields for linear and cyclic ethers // J. Chem.Theory and Comput. – 2007. – V. 3. – P. 1120-1133.
63. Mortier W. J, Ghosh S. K, Shankar S.Electronegativity-equalization method for the calculation of atomic charges in molecules // J. Am. Chem. Soc. – 1986. – V. 108. – P. 4315-4320.
64. Davis M. E, McCammon J. A. Electrostatics in biomolecular structure and dynamics // Chem Rev. – 1990. – V. 90. – P. 509-521.
65. Baker C. M. Polarizable force fields for molecular dynamics simulations of biomolecules // Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci. – 2015. – V. 5. – P. 241-254.
66. Head J. D., Zerner M. C. A Broyden—Fletcher—Goldfarb—Shanno optimization procedure for molecular geometries // Chem. Phys. Lett. – 1985. – V. 122. – P. 264-270.
67. Liu D. C., Nocedal J. On the limited memory BFGS method for large scale optimization // Math. Program. – 1989. –V. 45. – P. 503-528.
68. Becker O. M., MacKerell A. D. Jr., Roux B., Watanabe M. Computational Biochemistry and Biophysics // Dekker. 2001. 512 p.

69. Scott W. R. P., Hnenberger P. H., Tironi I. G., Mark A. E., Billeter S. R., Fennen J., Torda A. E., Huber T., Kruger P., van Gunsteren W. F. The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package // J. Phys. Chem. A. – 1999. – V. 103. – P. 3596 -3607.
70. Kaminski G. A., Friesner R. A., Tirado-Rives J., Jorgensen W. L. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides // J. Phys. Chem. B. – 2001. – V. 105. – P. 6474 – 6487.
71. Vanommeslaeghe K., Raman E.P., MacKerell Jr. A. D. Automation of the CHARMM general force field (CGenFF) II: assignment of bonded parameters and partial atomic charges // J. Chem. Inf. Model. – 2012. – V. 52. – P. 3155-3168.
72. Wang J., Wang W., Kollman P. A.; Case D. A. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations // J. Mol. Graph. Model. – 2006. – V. 25. – P. 247-260.
73. Oostenbrink C., Villa A., Mark A. E., van Gunsteren W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6 // J. Comput. Chem. – 2004. – V. 25. – P. 1656-1676.
74. Jorgensen W. L., Maxwell D. S., Tirado-Rives J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids // J. Am. Chem. Soc. – 1996. – V. 118. – P. 11225-11236.
75. Koch W., Holthausen M.C.A Chemist's Guide to Density Functional Theory // Wiley-VCH. 2001. 306 p.
76. Цирельсон В. Г. Квантовая химия. Молекулы, молекулярные системы и твёрдые тела // М. Бином: 2010. 496 с.
77. Pople J. A., Head-Gordon M., Raghavachari J. Quadratic configuration interaction. A general technique for determining electron correlation energies // J. Chem. Phys. – 1987. – V. 87. – P. 5968-5975.

78. Curtiss L. A. , Raghavachari K., Redfern P. C., Pople J. A. Assessment of Gaussian-3 and density functional theories for a larger experimental test set // J. Chem. Phys. – 2000. – V. 112. – P. 7374–7383.
79. Cramer C. J. Essentials of computational chemistry // John Wiley & Sons Ltd. 2004. 596 p.
80. Kim K., Jordan K. D. Comparison of density functional and MP2 calculations on the water monomer and dimer // J. Phys. Chem. – 1994. – V. 98. – P. 10089–10094.
81. Friesner R. A., Guallar V. Ab initio quantum chemical and mixed quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) methods for studying enzymatic catalysis // Annu. Rev. Phys. Chem. – 2005. – V. 56. – P. 389-487.
82. Vasilevskaya T., Khrenova M. G, Nemukhin A. V., Thiel W. Methodological aspects of QM/MM calculations: A case study on matrix metalloproteinase-2 // J. Comput. Chem. — 2016. — V. 37. — P. 1801–1809.
83. Vasilevskaya T., Khrenova M. G, Nemukhin A. V., Thiel W. Mechanism of proteolysis in matrix metalloproteinase-2 revealed by QM/MM modeling // Journal of Computational Chemistry. — 2015. — V. 36, no. 21. — P. 1621–1630.
84. Lippert G., Hutter J., Parrinello M. A hybrid Gaussian and plane wave density functional scheme // Mol. Phys. – 1997. – V. – 92. – P. 477 – 488.
85. VandeVondele J., Krack M., Mohamed F., Parrinello M., Chassaing T., Hutter J. Quickstep: fast and accurate density functional calculations using a mixed gaussian and plane waves approach // Comput. Phys. Commun. – 2005. – V. 167. – P. 103−128.
86. 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 // J. Mol. Biol. – 1999. – V. 285. – P. 1735−1747.
87. 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 // Comput. Phys. Commun. – 2010. – V. 181. – P. 1477−1489.

88. Blumberger J., Lamoureux G., Klein M. L. Peptide hydrolysis in thermolysin: ab initio QM/MM investigation of the Glu143-assisted water addition mechanism // J. Chem. Theory Comput. – 2007. – V. 3. – P. 1837−1850.
89. Wu R., Hu P., Wang S., Cao Z., Zhang Y. Flexibility of catalytic zinc coordination in thermolysin and HDAC8: a born−oppenheimer ab initio QM/MM molecular dynamics study // J. Chem. Theory Comput. – 2010. – V. 6. – P. 337−343.
90. Nemukhin A. V., Grigorenko B. L., Rogov A. V., Topol I. A., Burt S. K. Modeling of serine protease prototype reactions with the flexible effective fragment potential quantum mechanical/molecular mechanical method // Theor. Chem. Acc. – 2004. – V. 111. – P. 36−48.
91. Jensen F. Introduction to computational chemistry. // John Wiley & Sons Ltd. 2007. 619 p.
92. Hünenberger P. H. Thermostat algorithms for molecular dynamics simulations // Adv. Polym. Sci. – 2005. – V. 173. – P. 105-149.
93. Feller S. E., Zhang Y., Pastor R. W., Brooks B. R. Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method // J. Chem. Phys. – 1995. – V. 103. – P. 4613-4621.
94. Swope W. C., Andersen H. C., Berens H., Wilson K. R. A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: application to small water clusters // J. Chem. Phys. – 1982. – V. 76. – P. 637-649.
95. Sugitaa Y., Okamoto Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding // Chem. Phys. Lett. – 1999. – V. – 314. – P. 141-151.
96. Earl D. J., Deem. M. W. Parallel tempering: Theory, applications, and new perspectives // Phys. Chem. CHem. Phys. – 2005. – V. 7. – P. 3910-3916.

97. Phillips J. C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R. D., Kale L., Schulten K. Scalable molecular dynamics with NAMD // J. Comput. Chem. – 2005. – V. 26. – P. 1781−1802.
98. Jiang W., Luo Y., Maragliano L., Roux B. Calculation of free energy landscape in multi-dimensions with hamiltonian-exchange umbrella sampling on petascale supercomputer // J. Chem. Theory Comput. – 2012. – V. 8. – P. 4672−4680.
99. Isralewitz B., Baudry J., Gullingsrud J., Kosztin D., Schulten K. Steered molecular dynamics investigations of protein function // J. Mol. Graph. Model. – 2001. – V. 19: - P. 13-25.
100. Markus Y. Ionic radii in aqueous solutions // Chem. Rev. – 1988. – V. – 88. – P. 1475-1498.
101. Laitaoja M., Valjakka J., Janis J. Zinc coordination spheres in protein structures // Inorg. Chem. – 2013. – V. 52. – P. 10983-10991.
102. Dudev T., Dudev M., Lim C. First−second shell interactions in metal binding sites in proteins: a pdb survey and DFT/CDM calculations // J. Am. Chem. Soc. – 2003. – V. 125. – P. 3168-3180.
103. Sakharov D., Lim C. Zn protein simulations including charge transfer and local polarization effects // J. Am. Chem. Soc. – 2005. – V. 127. – P. 4921-2929.
104. Banci L. Molecular dynamics simulations of metalloproteins // Curr. Opin. Chem. Biol. – 2003. – V. 7. – P. 143-149.
105. Li P., Kenneth M. M. Jr. Metal ion modeling using classical mechanics // Chem. Rev. – 2017. – V. – 117. – P. 1564-1686.
106. Stote R. H., Karplus M. Zinc binding in proteins and solution: a simple but accurate nonbonded representation // Proteins. – 1995. – V. 23. – P. 12-31.
107. Pang Y.-P. Successful molecular dynamics simulation of two zinc complexes bridged by a hydroxide in phosphotriesterase using the cationic dummy atom method // Proteins. – 2001. – V. 9. – P. 1857-1865.

108. Jeziorski B., Moszynsk, R,; Szalewicz K. Perturbation theory approach to intermolecular potential energy surfaces of van der Waals complexes // Chem Rev. – 1994. – V. 94. – P. 1887−1930.
109. Navrátil V., Klusák V., Rulišek L. Theoretical aspects of hydrolysis of peptide bond by zinc metalloenzymes // Chem. Eur. J. – 2013. – V. 19. – P. 16634−16645.
110. Auld D. S., Vallee B. L. Kinetics of carboxypeptidase A. The pH dependence of tripeptide hydrolysis catalyzed by zinc, cobalt and manganese enzymes // Biochem.- 1970. – V. 9. – P. 4352-4359.
111. Kozuch S., Shaik S. Kinetic-quantum chemical model for catalytic cycles: the heber-bosch process and the effect of reagent concentration // J. Phys. Chem A. – 2008. – V. 112. – P. 6032−6041.
112. García-Melchor M., Braga A. A. C., Lledó s A., Ujaque G., Feliu Maseras F. Computational perspectives on pd catalyzed c-c crosscoupling reaction mechanism // Acc. Chem. Res. – 2013. – V. 46. – P. 2626−2634.
113. Engelin C., Jensen T., Rodriguez-Rodriguez S., Fristrup P. Mechanistic investigation of palladium-catalyzed allylic c−h activation // ACS Catal. – 2013. – V. 3. – P. 294−302.
114. Christiansen J. A. The Elucidation of Reaction Mechanisms by the Method of Intermediates in Quasi-Stationary Concentrations // Adv. Catal. – 1953. – V. 5. – P. 311−353.
115. Maksay G., Marsh J. A. Signalling assemblies: the odds of symmetry // Biochem. Soc. Trans. – 2017. – V. 45. – P. 599−611.
116. Brown J. H. Breaking symmetry in protein dimers: designs and functions // Protein Sci. – 2006. – V. 15. – P. 1−13.
117. Monod J., Wyman J., Changeux J. P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model // J. Mol. Biol. – 1965. – V. 12. – P. 88-118.
118. Gunasekaran K., Ma B., Nussinov R. Is allostery an intrinsic property of all dynamic proteins? // Proteins. – 2004. – V. 57. – P. 433-443.

119. Tsai C. J., del Sol A., Nussinov R. Allostery: absence of a change in shape does not imply that allostery is not at play // J. Mol. Biol. – 2008. – V. 378. – P. 1-11.
120. Tsai C.J., del Sol A., Nussinov R. Protein allostery, signal transmission and dynamics: a classification scheme of allosteric mechanisms // Mol. Biosyst. – 2009. – V. 5. – P. 207–216.
121. Del Sol A., Tsai C. J., Nussinov R. The origin of allosteric functional modulation: multiple pre-existing pathways // Structure. – 2009. – V. 17. – P. 1042-1050.
122. Wagner J. R., Lee C. T., Durrant J. D., Malmstrom R. D., Feher V. A., Amaro R. E. Emerging computational methods for the rational discovery of allosteric drugs // Chem. Rev. – 2016. – V. 116. – P. 6370-6390.
123. Koromyslova A.D., Chugunov A.O., Efremov R.G. Deciphering Fine Molecular Details of Proteins' Structure and Function with a Protein Surface Topography (PST) Method // J. Chem. Inform. Model. – 2014. – V. 54. – P. 1189–1199.
124. Huang W., Lu S., Huang Z., Liu X., Mou L., Luo Y., Zhao Y., Liu Y., Chen Z., Hou T., Zhang J. Allosite: a method for predicting allosteric sites // Bioinformatics. – 2013. – V. 29. – P. 2357−2359.
125. Shen Q., Wang G., Li S., Liu X., Chen Z., Song K., Yan J., Geng L., Huang Z., Huang W., Chen G., Zhang J., Lu S. ASD v3.0: unraveling allosteric regulation with structural mechanisms and biological networks // Nucleic Acids Res. – 2016. – V. 44. – P. 527−535.
126. Bakan A, Meireles LM, Bahar I ProDy: Protein dynamics inferred from theory and experiments // Bioinformatics. – 2011. – V. 27. – P. 1575-1577.
127. Halgren T. A. Identifying and characterizing binding sites and assessing druggability // J. Chem. Inf. Model. – 2009. – V. 49. – P. 377−389.
128. 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 // J. Comput. Chem. – 2009. – V. 30. – P. 2785−2791.

129. Solis F. J., Wets R. J. B. Minimization by random search techniques // Math. Oper. Res. – 1981. – V. 6. – P. 19−30.
130. Wang Y., Harriso C. B., Schulten K., McCammon J. A. Implementation of accelerated molecular dynamics in NAMD // Comput. Sci. Discovery. – 2011. – V. 4. – P. 1-10.
131. Sethi A., Eargle J., Black A. A., Luthey-Schulten Z. Dynamical networks in tRNA: protein complexes // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2009. – V. 106. – P. 6620−6625.
132. VanWart A. T., Eargle J., Luthey-Schulten Z., Amaro R. E. Exploring residue component contributions to dynamical network models of aalostery // J. Chem. Theory Comput. – 2012. – V. 8. – P. 2949-2961.
133. Warshall S. A theorem on boolean matrices // J. Assoc. Comput. Mach. – 1962. – V. 9. – P. 11.
134. Floyd R. W. Algorithm-97 - shortest path // Commun. ACM. – 1962. – V. 5. – P. 345−345.
135. Girvan M., Newman M. E. Community structure in social and biological networks // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2002. – V. 99. – P. 7821−7826.
136. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics // J. Mol. Graphics – 1996. – V. 14. – P. 33−38.
137. Shannon P. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks // Genome Res. – 2003. – V. 13. – P. 2498−2504.
138. Chodera J. D., Noé F. Markov state models of biomolecular conformational dynamics // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2014. – V. 25. – P. 135−144.
139. Pande V. S., Beauchamp K., Bowman G. R. Everything you wanted to know about Markov State Models but were afraid to ask // Methods. – 2010. – V. 52. – P. 99-105.

140. Wagner J. R., Lee C. T., Durrant J. D., Malmstrom R. D., Feher V. A., Amaro R. E. Emerging computational methods for the rational discovery of allosteric drugs // Chem. Rev. – 2016. – V. 116. – P. 6370-6390.
141. Романовский Ю. М., Тихонов А. В. Протонная АТФ-синтаза – вращающийся молекулярный мотор // Успехи Физических Наук – 2010. – Т. 180. – С. 893-914.
142. Noe F., Clementi C. Kinetic distance and kinetic maps from molecular dynamics simulation // J. Chem. Theory Comput. – 2015. – V. 11. – P. 5002-5011.
143. Pearson K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space // Philos. Mag. – 1901. – V. 2. – P. 559-572.
144. Hotelling H. Analysis of a comples of statistical variables into principal components // J. Edu. Psych. – 1933. – V. 24. – P. 417-441.
145. Molgedey L., Schuster H. G. Separation of a mixture of independent signals using time delayed correlations // Phys. Rev. Lett. – 1994. – V. 72. – P. 3634-3637.
146. Noe F., Nuske F. A variational approach to modeling slow processes in stochastic dynamical systems // Multiscale Model. Simul. – 2013. – V. 11. – P. 635-655.
147. Voronoi M G. Nouvelles applications des parametres continus a la theorie des formes quadratic //J. Reine Angew. Math. – 1908. – V. 134. – P. 198-287.
148. Lloyd S. P. Last squares quantization in PCM // IEEE Trans. Inf. Theory. – 1982. – V. 28. – P. 129-137.
149. Deuflhard P., Weber M., Dellnitz M., Kirkland S., Neumann M., Schütte C. Robust Perron cluster analysis in conformation dynamics // Linear Algebra Its Appl. – 2005. – V. 398. - P 161−184.
150. Scherer M. K., Trendelkamp-Schroer B., Paul F., Pérez-Hernández G., Hoffmann M., Plattner N., Wehmeyer C., Prinz J.-H., Noé F. PyEMMA 2: A software package for estimation, validation, and analysis of Markov Models // J. Chem. Theory Comput. – 2015. – V. 11. – P. 5525−5542.