



УДК 539.193:577.153

МЕТОД ТЕОРЕТИЧЕСКОГО КОНФОРМАЦИОННОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТИВНЫХ КОНФОРМАЦИЙ СУБСТРАТОВ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

© 2005 г. Д. А. Белинская[#], Н. Н. Шестакова*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
194223, С.-Петербург, пр. М. Тореза, 44*

Поступила в редакцию 14.01.2005 г. Принята к печати 01.03.2005 г.

Методом молекулярной механики проведены расчеты всех устойчивых конформаций 34 аналогов ацетилхолина (ACh) с общей формулой $R-C(O)O-Alk-N^+(CH_3)_3$. В ряду $R-C(O)O-(CH_2)_2-N^+(CH_3)_3$ для ацетилхолинэстеразы выявлена достоверная корреляция между объемом молекулы субстрата и скоростью его ферментативного гидролиза; для бутирилхолинэстеразы показано отсутствие подобной зависимости.

Методами теоретического конформационного анализа (ТКА) подтверждена продуктивность полностью вытянутой (*tt*) конформации ACh для расщепления ацетилхолинэстеразой, что согласуется с результатами рентгеноструктурного анализа кристалла фермента. Показано, что ацетилхолинэстераза может гидролизовать только те субстраты, которые формируют устойчивые конформеры, совместимые по взаимному расположению триметиламмониевой группировки, карбонильного углерода и карбонильного кислорода с *tt*-конформацией ACh; при этом скорость гидролиза субстрата зависит от суммарной заселенности этих конформеров. Обнаружена достоверная корреляция между заселенностью полусвернутой (*tg*⁻) конформации холинного фрагмента молекул субстратов и скоростью их расщепления бутирилхолинэстеразой. Показано, что в ряду $CH_3-C(O)O-Alk-N^+(CH_3)_3$ скорость расщепления бутирилхолинэстеразой зависит от суммарной заселенности конформаций, совместимых по взаимному расположению функционально значимых атомов с *tg*⁻-конформацией ACh. Сделан вывод о продуктивности по отношению к бутирилхолинэстеразе *tg*⁻-конформации ACh. Показано, что ориентации молекул субстратов относительно каталитической триады при продуктивной сорбции в активном центре обеих холинэстераз совпадают. Выдвинуто предположение, что в случае холинэстеразного гидролиза сорбционная стадия является лимитирующей и фермент гидролизует молекулу субстрата в энергетически устойчивой конформации.

Ключевые слова: ацетилхолинэстераза; бутирилхолинэстераза; ацетилхолин; теоретический конформационный анализ; структурно-функциональные отношения; продуктивная сорбция.

ВВЕДЕНИЕ

Холинэстеразы, относящиеся к классу сериновых гидролаз, по субстратно-ингибиторной специфичности подразделяются на две группы: ацетилхолинэстеразы (AChE, КФ 3.1.1.7) и бутирилхолинэстеразы (BChE, КФ 3.1.1.8). Ацетилхолинэстераза принимает участие в проведении нервного импульса, гидролизуя свой природный нейромедиатор ацетилхолин (ACh), и является мишенью для действия фосфорорганических ингибиторов и нервно-паралитических отравляющих веществ [1–5]. Хотя физиологическая функция бутирилхолинэстераз до конца не определена, этот фермент также представляет огромный интерес, поскольку известно, что он может гидролизовать токсичные

эфирь, в том числе кокаин, и нервно-паралитические отравляющие вещества, такие, как зоман [6–9]. Для исследования этих ферментов были разработаны методы выделения и очистки, синтезированы и опробированы сотни веществ, являющихся их субстратами и ингибиторами, найдены значения кинетических констант взаимодействия эффекторов с ферментами [6, 7]. Таким образом, обе эстеразы могут быть использованы в качестве моделей для изучения принципов механизма действия ферментов.

Проведенный ранее теоретический конформационный анализ (ТКА) субстратов AChE [10] выявил, что из семи устойчивых конформаций ACh только полностью вытянутая является продуктивной для ферментативного гидролиза. Было показано, что в ряду аналогов ACh с общей формулой $R-C(O)O-Alk-N^+(CH_3)_3$ под действием

[#] Автор для переписки (тел.: (812) 225-75-63; эл. почта: d_belinskaya@mail.ru).

АСhE гидролизуются только те, устойчивые конформеры которых совместимы с продуктивной конформацией АСh по взаимному расположению функционально значимых атомов (азота, карбонильного углерода и карбонильного кислорода) [11]. Отклонения значений расстояний между функциональными атомами не должно превышать 0.2 Å. Это означает, что положение ацильной и триметиламмониевой группировок АСh при продуктивной сорбции в активном центре АСhE строго детерминировано, следовательно, можно проводить отбор продуктивных конформаций субстрата по значению расстояний между его функционально значимыми атомами. Определена ориентация АСh при продуктивной сорбции в активном центре АСhE [12]. Все выявленные особенности строения активного центра фермента позже были подтверждены результатами рентгеноструктурного анализа кристалла АСhE *Torpedo californica* [13] и процедурами стыковки вручную (manual docking). Это доказывает применимость метода ТКА для исследования механизма действия ферментов. Ранее на основе данных рентгеноструктурного анализа АСhE методом минимизации энергии была построена компьютерная модель ВСhE [14]. Авторы показали, что активный центр ВСhE также расположен в глубине белковой глобулы, но имеет стерические размеры большие, чем у АСhE. Недавно был проведен рентгеноструктурный анализ ВСhE человека [15], который подтвердил полученные ранее теоретические данные и выявил некоторые различия в аминокислотном составе активных центров двух холинэстераз. Были определены отличительные особенности связывания ими ингибиторов – 3-бромпропионата и зомана. Однако вопрос о продуктивной конформации молекулы субстрата ВСhE остается открытым, поскольку нет возможности получить кристалл продуктивного фермент-субстратного комплекса.

Сопоставление результатов ТКА низкомолекулярных субстратов холинэстераз со значениями кинетических характеристик их гидролиза позволяет не только определить продуктивную для взаимодействия с ферментом конформацию молекулы субстрата, но и получить представления об особенностях структуры активного центра фермента и механизме фермент-субстратного взаимодействия.

В данной работе для определения продуктивной конформации АСh при его расщеплении ВСhE и выявления особенностей механизма действия двух эстераз был проведен ТКА 34 аналогов АСh с общей формулой $R-C(O)O-Alk-N^+(CH_3)_3$. Список соединений и литературные данные об относительных скоростях их гидролиза под действием АСhE и ВСhE приведены в табл. 1.

МЕТОДЫ

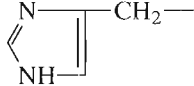
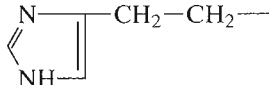
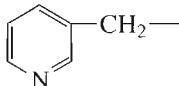
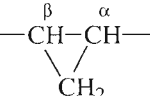
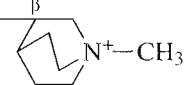
Метод анализа структурно-функциональных отношений предполагает существование комплементарности структуры субстрата строению сорбционного участка активного центра фермента. Сопоставляя структуру молекул субстратов с эффективностью их расщепления ферментом, можно делать выводы не только о роли в ферментативном гидролизе функциональных групп субстрата, но и о расположении и функциональной роли специфических участков активного центра фермента. В качестве структурных параметров субстратов мы использовали энергетические и геометрические характеристики полного набора устойчивых *in vitro* кинетических константы гидролиза субстратов под действием АСhE и ВСhE [6, 7].

Расчеты параметров трехмерной структуры молекул (значения валентных и торсионных углов, объем молекул, расстояния между функционально значимыми атомами) проводили методом молекулярной механики с помощью универсальной конформационной программы ZMM [16] в потенциальном поле Дашевского [17]. Устойчивые конформации отыскивали путем минимизации энергии при варьировании значений торсионных и валентных углов; длины связей принимали постоянными. Конформационную энергию представляли в виде суммы энергий невалентных, торсионных, электростатических взаимодействий, энергии деформации валентных углов и энергии замыкания циклов. Плотность зарядов на атомах была рассчитана с помощью программы CNDO/2 [18]. Расчет объемов молекул по данным о значениях ван-дер-ваальсовых радиусов атомов проводили с помощью программы Volume [19]. Графические изображения молекул получали с помощью программ MolGraph и HyperChem7 [20].

Взаимное расположение функционально значимых атомов (азот, карбонильный кислород и карбонильный углерод) у всех представленных соединений, кроме соединений (XXXI) и (XXXII), зависит от значений торсионных углов холинового фрагмента: τ_0 ($CH_3-C(O)-O-C^\beta$), τ_1 ($C(O)-O-C^\beta-C^\alpha$), τ_2 ($O-C^\beta-C^\alpha-N$). Для угла τ_0 возможна только *цис*- или *транс*-конформация, но энергия *цис*-конформера более чем на 3 ккал/моль выше, поэтому при расчете использовалась только *транс*-конформация. Таким образом, для описания холинового фрагмента указанных соединений варьировались значения двух углов τ_1 и τ_2 .

Для соединений (XXXI) и (XXXII) по той же причине значения углов τ_0' и τ_0'' ($(CH_3-C(O)-O-C^\gamma)$ и $(CH_3-C(O)-O-C^\delta)$ соответственно) также принимали равными 180°. Для соединения (XXXI) варьировали значения углов τ_1' ($C(O)-O-C^\gamma-C^\beta$),

Таблица 1. Аналоги ацетилхолина (I) с общей формулой R-C(O)O-Alk-N⁺(CH₃)₃ и относительные скорости их гидролиза под действием AChE и BChE

Соединение	R	Alk	Конфигурация атомов		AChE, V _{отн.} %	BChE, V _{отн.} %	Ссылка
			C ^α	C ^β			
(I)	CH ₃ -	-C ^β H ₂ -C ^α H ₂ -			100	100	[7]
(II)	H-	»			66	180	»
(III)	C ₂ H ₅ -	»			70	180	»
(IV)	C ₃ H ₇ -	»			2	240	»
(V)	C ₄ H ₉ -	»			1	180	»
(VI)	(CH ₃) ₂ CH-	»			40	108	»
(VII)	C ₂ H ₅ (CH ₃)CH-*	»			1	13	»
(VIII)	(C ₂ H ₅) ₂ CH-	»			0	16	»
(IX)	CH ₂ =CH-	»			12	100	»
(X)	CH ₃ CH=CH-	»			2	20	»
(XI)	CH ₂ =CHCH ₂ -	»			11	186	»
(XII)	CH ₂ =C(CH ₃)-	»			20	47	»
(XIII)	C ₂ H ₅ CH=CH-*	»			0	10	»
(XIV)	CH ₂ =CHCH ₂ CH ₂ -	»			0	220	»
(XV)	CH ₃ CH=C(CH ₃)-	»			0	11	»
(XVI)	(CH ₃) ₂ C=CH-*	»			0	0	[6]
(XVII)	CH ₃ CH=C(C ₂ H ₅)-*	»			0	9	»
(XVIII)	C ₆ H ₅ -	»			0	50	[7]
(XIX)	C ₆ H ₅ CH ₂ CH ₂ -	»			0	195	»
(XX)		»			0	50	»
(XXI)		»			0	240	»
(XXII)		»			0	40	»
(XXIII)	CH ₃ -	-CH ₂ -C ^α H(CH ₃)-	R		84	150	»
(XXIV)	CH ₃ -	»	S		110	150	»
(XXV)	C ₃ H ₇ -	-C ^β H(CH ₃)-CH ₂ -		R	0	0	»
(XXVI)	»	»		S	0	10	»
(XXVII)	CH ₃ -		R	R	56	33	»
(XXVIII)	»	»	S	S	96	61	»
(XXIX)	»	»	R	S	0	0	»
(XXX)	»	»	S	R	0	0	»
(XXXI)	»	-C ^γ H ₂ -C ^β H ₂ -C ^α H ₂ -			70	7.2	»
(XXXII)	»	-C ^δ H ₂ -C ^γ H ₂ -C ^β H ₂ -C ^α H ₂ -			10	0.6	»
(XXXIII)	»			R	0.8	0	»
(XXXIV)	»	»		S	103	45	»

* Рацемат.

τ_2' ($O-C^\gamma-C^\beta-C^\alpha$), τ_3' ($C^\gamma-C^\beta-C^\alpha-N$); для соединения (XXXII) – значения углов τ_1'' ($C(O)-O-C^\delta-C^\gamma$), τ_2'' ($O-C^\delta-C^\gamma-C^\beta$), τ_3'' ($C^\delta-C^\gamma-C^\beta-C^\alpha$), τ_4'' ($C^\gamma-C^\beta-C^\alpha-N$).

Геометрические параметры конформации холинового фрагмента были рассчитаны следующим образом: варьировали значения всех торсионных углов соединения (в том числе и ацильной части молекулы), кроме угла τ_0 , двойных связей и углов жестких циклов. Для каждой из возможных конформаций определяли вероятность ее существования (заселенность) по формуле: $P_i = \exp(\Delta E_i/RT) / \sum_{\text{exp}} (\Delta E_j/RT)$, где ΔE_j – энергия j -го конформационного состояния, отсчитанная от глобального энергетического минимума молекулы. На следующем этапе отбирали конформации, соответствующие данному значению углов τ_1 и τ_2 или расстоянию между функционально значимыми атомами – для них подсчитывали суммарные заселенности.

Достоверность корреляций оценивали по критерию Фишера, коэффициент корреляции принимался достоверным, если уровень значимости не превышал 0.05.

Транс-, *gauche*⁺, *gauche*⁻ и торсионные углы +120° и -120° обозначались символами *t*, *g*, *g*⁻, *a* и *a*⁻ соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Корреляционный анализ подтвердил выявленную ранее зависимость между объемами молекул и скоростью их гидролиза под действием АСнЕ [21]. Примечательно, что подобной зависимости для ВСнЕ выявлено не было (табл. 2). Такое различие для двух ферментов согласуется с результатами их рентгеноструктурного анализа, который выявил, что стерические размеры активного центра ВСнЕ, по крайней мере в районе каталитической триады и подхода к центру, существенно больше, чем у АСнЕ [14, 15]. В частности, было показано, что аминокислотным остаткам Phe288 и Phe290 активного центра АСнЕ соответствуют менее массивные Leu286 и Val288 активного центра ВСнЕ.

Конформационный анализ соединений (I)–(XXII) показал, что для них, независимо от строения ацильной группировки, существует только семь устойчивых конформаций холинового фрагмента: *gg*, *gt*, *tg*, *tt*, *tg*⁻, *g*⁻*t*, *g*⁻*g*⁻. Корреляционный анализ суммарных заселенностей этих конформаций (табл. 2) подтвердил наличие достоверной корреляции между заселенностью *tt*-конформации холинового фрагмента молекул субстратов и скоростью их расщепления АСнЕ, что подтверждает продуктивность этой конформации субстрата для АСнЕ [11]. В случае ВСнЕ аналогичная корреляция была выявлена для *tg*⁻-конформации холинового фрагмента, что позволяет выделить ее как продуктивную для субстратов этой эстеразы.

Для соединений (XXIII)–(XXXIV) были рассчитаны параметры всех возможных устойчивых конформаций, затем были отобраны те, которые по расстоянию между карбонильным углеродом и азотом (d_{CN}) и карбонильным кислородом и азотом (d_{ON}) соответствуют *tg*⁻-конформации АСн (величина отклонения значений расстояний между функциональными атомами не превышала 0.2 Å). Была выявлена достоверная корреляция между суммарной заселенностью Алк-фрагмента отобранных конформаций и скоростью гидролиза данного ряда субстратов под действием ВСнЕ (табл. 3). Это также подтверждает продуктивность *tg*⁻-конформации субстрата для ВСнЕ [22] (рисунок).

tt- и *tg*⁻-Конформации АСн различаются расстоянием между функционально значимыми атомами (в *tt*-конформации $d_{CN} = 4.9$ и $d_{ON} = 5.1$ Å, в *tg*⁻-конформации – 4.5 и 5.0 Å соответственно). Расстояния между функционально значимыми атомами (карбонильным углеродом, карбонильным кислородом и азотом) могут быть критерием для отбора продуктивных конформеров триметилламмониевых аналогов АСн для гидролиза под действием этих ферментов.

Выявленные различия в скоростях гидролиза для пар энантиомеров циклопропильного аналога АСн ((XXVII)–(XXX)) и бутирил-β-метилхолина ((XXV), (XXVI)) при одинаковых заселенностях их *tg*⁻-подобных конформаций свидетельствует о том, что в активном центре ВСнЕ в направлении *R*-энантиотопных атомов водорода продуктивно сорбированного *tg*⁻-конформера АСн имеется область существенного объема фермента, а со стороны *S*-энантиотопных атомов – область исключенного объема. Эти области можно рассматривать как дно ущелья и входа в него соответственно. Ранее было показано, что активный центр АСнЕ имеет такую же конфигурацию [12]. Таким образом, можно говорить о совпадении ориентации аминокислотных остатков каталитической триады и продуктивно сорбированной молекулы субстрата относительно входа в ущелье активного центра для обоих ферментов. По всей видимости, именно со стороны области существенного объема производится атака гидроксила серина на карбонильный углерод. Но оба изомера ацетил-α-метилхолина ((XXIII) и (XXIV)) расщепляются ВСнЕ с одинаковой скоростью (гидролиз под действием АСнЕ проходит с разными скоростями). Это может означать, что протяженность области существенного объема у ВСнЕ меньше, чем у АСнЕ (рисунок), что согласуется с мнением авторов работы [23]. Это обстоятельство также является фактором, обуславливающим субстратную специфичность этих эстераз.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что гидролиз под действием обеих эстераз

Таблица 2. Кинетические и геометрические характеристики молекул ацетилхолина (I) и его аналогов с общей формулой $R-C(O)O(CH_2)_2N^+(CH_3)_3$ (соединения (II)–(XXII)). Результаты корреляционного анализа возможных зависимостей скоростей гидролиза под действием ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы от объема молекул и заселенностей устойчивых конформаций холинового фрагмента* соединений (I)–(XXII)

Соединение	AChE, $V_{отн}, \%$	BChE, $V_{отн}, \%$	Объем молекулы, Å^3	Заселенность устойчивых конформаций углов τ_1 и τ_2^{**} , %						
				gg	gt	tg	tt	tg ⁻	g ⁻ t	g ⁻ g ⁻
(I)	100	100	131.0	15.2	14.8	14.1	11.2	14.4	15.1	15.2
(II)	66	180	90.4	14.8	11.4	20.1	12.6	16.4	12.1	12.6
(III)	70	180	141.6	24.6	10.0	15.2	7.0	12.7	10.7	19.8
(IV)	2	240	152.2	18.7	9.0	14.6	4.8	15.7	9.0	28.2
(V)	1	180	162.8	21.9	10.1	13.1	4.7	17.6	9.4	23.4
(VI)	40	108	152.2	21.5	9.0	12.4	5.1	14.7	8.5	28.8
(VII)	1	13	162.8	25.9	8.0	17.1	3.8	16.4	7.8	21.3
(VIII)	0	16	173.4	19.3	6.8	16.3	2.8	17.6	6.0	29.7
(IX)	12	100	138.3	14.3	13.6	14.5	9.4	17.6	12.9	17.7
(X)	2	20	148.9	19.8	14.3	14.3	7.1	13.0	14.5	16.9
(XI)	11	186	148.9	20.5	10.3	15.5	7.0	15.7	10.2	20.9
(XII)	20	47	148.9	20.8	15.1	10.1	6.4	10.9	13.6	23.3
(XIII)	0	10	159.4	18.9	13.2	19.0	5.2	14.3	14.3	15.1
(XIV)	0	220	148.9	20.8	7.4	22.7	4.7	18.6	7.8	17.7
(XV)	0	11	159.4	18.7	27.9	3.1	0.9	3.3	26.9	19.2
(XVI)	0	0	159.4	20.0	12.0	17.6	6.0	15.0	12.7	16.9
(XVII)	0	9	170.0	23.8	11.3	12.8	4.4	13.8	11.5	22.5
(XVIII)	0	50	193.5	30.4	2.1	12.2	1.5	14.5	2.2	37.1
(XIX)	0	195	208.4	10.6	14.7	17.9	13.2	18.1	14.8	10.6
(XX)	0	50	187.2	23.6	11.0	11.1	0.0	14.0	10.3	30.2
(XXI)	0	240	211.6	16.5	9.1	16.4	4.9	29.5	7.1	16.0
(XXII)	0	40	200.5	35.5	2.2	17.0	0.6	13.6	2.1	29.0
AChE										
Кэфф. корр.			-0.62***	-0.22	0.11	0.04	0.55***	-0.11	0.15	-0.26
Кэфф. Фишера			3.57	1.03	0.50	0.19	2.96	0.49	0.69	1.22
Уровень значим.			<0.01	0.30	0.60	>0.80	<0.01	0.60	0.50	>0.2
BChE										
Кэфф. корр.			-0.09	-0.36	-0.16	0.35	0.41	0.55***	-0.18	-0.24
Кэфф. Фишера			0.41	1.74	0.75	1.66	2.01	2.93	0.80	1.12
Уровень значим.			>0.60	0.10	>0.40	>0.10	>0.05	<0.01	0.40	>0.20

* Холиновый фрагмент аналогов ACh: $C(O)-O-C^{\beta}-C^{\alpha}-N^+$.

** Углы τ_1 : $(C(O)-O-C^{\beta}-C^{\alpha})$; τ_2 : $(O-C^{\beta}-C^{\alpha}-N)$; *t, g, g⁻* – *транс-, гом⁺-, гом⁻*-конформации торсионных углов соответственно.

*** Достоверные корреляции.

характеризуется строгой фиксацией триметиламмониевой группировки в их активном центре (отклонение не превышает 0.2 Å). Ранее было показано, что триметиламмониевая группировка фиксируется стекинг-взаимодействием с остатком Trp анионного центра (Trp84 в случае AChE и Trp82 – в случае BChE) [13, 15]. Однако этого взаимодействия недостаточно для такого

сильного “закрепления”. Авторы работы [23], исследуя сорбцию бензоилхинуклидинового аналога ACh (в активном центре BChE), выдвинули гипотезу, что положение аммониевой группировки дополнительно стабилизируется водородной связью с остатком Glu199. Это предположение может объяснять выявленную нами особенность сорбции.

Таблица 3. Скорости гидролиза соединений (I), (XXIII)–(XXXIV) под действием бутирилхолинэстеразы. Суммарные заселенности устойчивых конформаций, совместимых по взаимному расположению функциональных атомов (азот, карбоксильные углерод и кислород) с tg^- -конформацией холинового фрагмента ацетилхолина*. Результаты корреляционного анализа зависимости скорости гидролиза от заселенности рассматриваемых конформаций

Соединение	VChE, $V_{отн}$, %	Суммарная заселенность, %	d_{CN} , Å	d_{ON} , Å	Конформация фрагмента –Alk–
(I)	100	14.4	4.5	5.0	tg^-
(XXIII)	150	34.6	4.4	5.0	tg, tg^-
(XXIV)	150	36.0	4.4	5.0	tg, tg^-
(XXV)	0	2.9	4.4	5.0	tg
(XXVI)	10	2.4	4.4	5.0	tg^-
(XXVII)	33	43.4	4.7	5.0	ta^-
(XXVIII)	61	43.7	4.7	5.0	ta
(XXIX)	0	0.0	–	–	нск****
(XXX)	0	0.0	–	–	нск
(XXXI)**	7.2	5.3	4.5	5.0	$ggg, ggg^-, g^-g^-g, g^-g^-g^-$
(XXXII)***	0.6	0.0	–	–	нск
(XXXIII)	0	0.0	–	–	нск
(XXXIV)	45	50.1	4.6	5.0	ta
VChE					
Коэфф. Корр.		0.62			
Коэфф. Фишера		2.63			
Уровень значимости		<0.05			

* d_{CN} , d_{ON} – расстояние между атомом карбоксильного углерода и атомом азота и между атомом карбоксильного кислорода и атомом азота; t, g, g^-, a, a^- – *транс* (180°), *гош*⁺ ($+60^\circ$), *гош*[–] (-60°), $+120^\circ$ и -120° углы соответственно.

** Рассматриваются конформации фрагмента $O-C^\gamma H_2-C^\beta H_2-C^\alpha H_2-N^+$, варьируются углы: τ_1' ($C(O)-O-C^\gamma-C^\beta$), τ_2' ($O-C^\gamma-C^\beta-C^\alpha$), τ_3' ($C^\gamma-C^\beta-C^\alpha-N$).

*** Рассматриваются конформации фрагмента $O-C^\delta H_2-C^\gamma H_2-C^\beta H_2-C^\alpha H_2-N^+$, варьируются углы: τ_1'' ($C(O)-O-C^\delta-C^\gamma$), τ_2'' ($O-C^\delta-C^\gamma-C^\beta$), τ_3'' ($C^\delta-C^\gamma-C^\beta-C^\alpha$), τ_4'' ($C^\gamma-C^\beta-C^\alpha-N$).

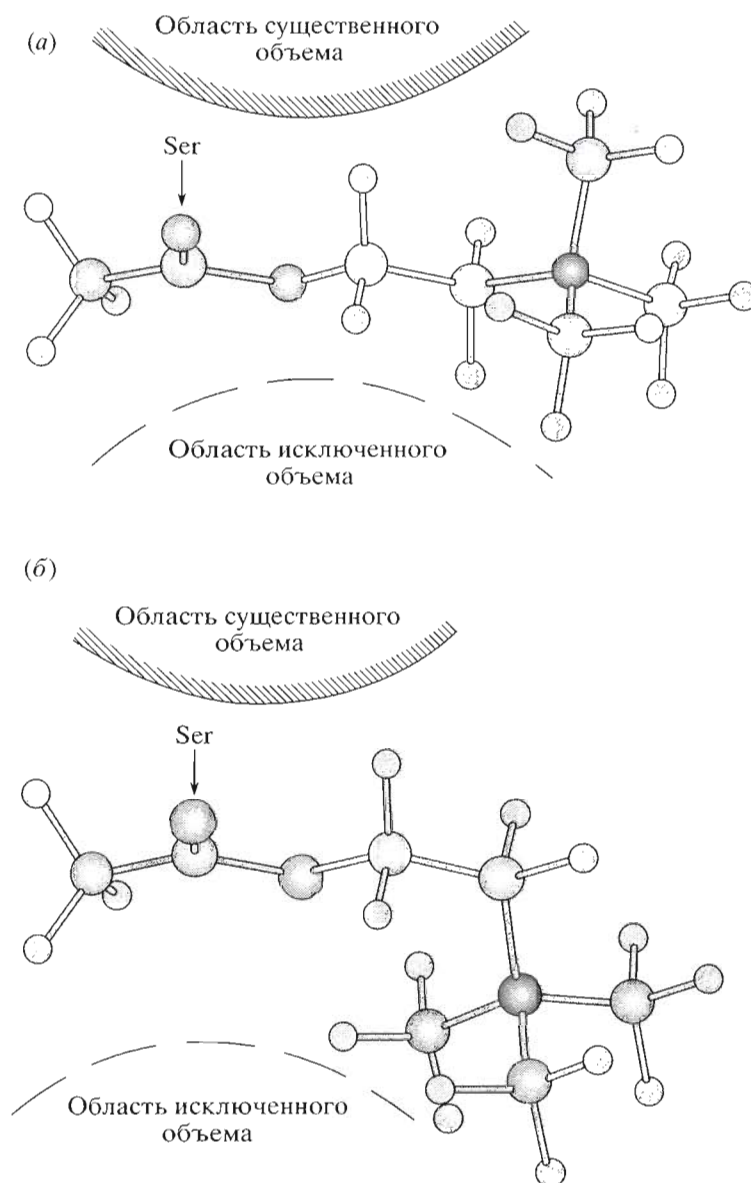
**** нск – нет соответствующих конформаций.

В данной работе поиск возможных корреляций проводился при сопоставлении геометрических параметров энергетически устойчивых конформеров изолированных молекул субстратов с их кинетическими характеристиками взаимодействия с ферментами. В принципе, такой подход моделирует только стадию сорбции, т.е. комплементарное соответствие структуры субстрата и активного центра фермента. Наличие связи между параметрами изолированных молекул субстратов и обобщенных кинетических характеристик указывает на то, что стадия сорбции субстратов в активном центре холинэстераз является лимитирующей.

Обычно предполагается, что при ферментативном гидролизе происходит изменение конфор-

мации субстрата. Однако известно, что *SS*-энантиомер жесткого циклопропильного аналога ACh (XXVIII) и *S*-энантиомер хинуклидинового аналога ACh (XXXIV) гидролизуются обеими холинэстеразами с высокими скоростями (табл. 1), хотя даже незначительное изменение значений торсионных углов холинового фрагмента потребовало бы разрыва ковалентных связей и, значит, больших затрат энергии, и следовательно, повлекло бы уменьшение скорости гидролиза этих соединений.

В процессе работы фермента конформации как самого фермента, так и продуктов реакции могут изменяться для того, чтобы продукты реакции могли беспрепятственно покинуть активный центр. В частности, существует гипотеза, что после связывания AChE с субстратом образуется



Модели активных центров ацетилхолинэстеразы (а) и бутирилхолинэстеразы (б) относительно продуктивно сорбированных *и*- и *lg*⁻-конформеров ацетилхолина.

так называемая “боковая дверь” (back door) – коридор, через который продукты – ацетат и холин покидают фермент [13]. Для VChE аналогичного коридора пока найдено не было, но схожее изменение конформации можно предположить.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят доктора Флориана Нашона (Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, Unité d'Enzymologie, France) за замечания, высказанные при обсуждении результатов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бресткин А.П., Розенгарт Е.В., Абдувахобов А.А., Садыков А.С. // Успехи химии. 1983. Т. 52. С. 1624–1647.
2. Басова Н.Е., Розенгарт Е.В., Хованских А.Е. // Журн. эволюц. биохим. и физиол. 2000. Т. 36. С. 97–102.
3. Моралев С.Н., Розенгарт Е.В. // Журн. эволюц. биохим. и физиол. 2001. Т. 37. С. 358–373.
4. Розенгарт Е.В., Басова Н.Е., Суворов А.А., Хованских А.Е. // Журн. эволюц. биохим. и физиол. 2002. Т. 38. С. 14–19.
5. Розенгарт Е.В., Басова Н.Е., Суворов А.А. // Журн. эволюц. биохим. и физиол. 2002. Т. 38. С. 209–213.

6. Садыков А.С., Розенгарт Е.В., Абдувахобов А.А., Асланов Х.А. Холинэстеразы. Активный центр и механизм действия. Ташкент: Фан, 1976. 208 с.
7. Бресткин А.П., Кузнецова Л.П., Моралев С.Н., Розенгарт Е.В., Эшттейн Л.М. Холинэстеразы наземных животных и гидробионтов. Владивосток: Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (ТИНРО-центр), 1997. 466 с.
8. Allon N., Raveh L., Gilat E., Cohen E., Grunwald J., Ashani Y. // *Toxicol. Sci.* 1998. V. 43. P. 121–128.
9. Nese Cokugras A. // *Turkish J. of Biochemistry.* 2003. V. 28. P. 54–61.
10. Шестакова Н.Н., Розенгарт Е.В., Хованских А.Е., Жоров Б.С., Говырин В.А. // *Биоорганическая химия.* 1989. Т. 15. С. 335–344.
11. Zhorov B.S., Shestakova N.N., Rozengart E.V. // *Quant. Struct.-Act. Relat.* 1991. V. 10. P. 205–210.
12. Шестакова Н.Н., Розенгарт Е.В. // *Биоорганическая химия.* 1995. Т. 21. С. 323–329.
13. Sussman I., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L., Silman I. // *Science.* 1991. V. 253. P. 872–875.
14. Millard C.B., Broomfield C.A. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1992. V. 189. P. 1280–1286.
15. Nicolet Y., Lockridge O., Musson P., Fontecilla-Camps J.C., Nachon F. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 41141–41147.
16. Жоров Б.С. // *Автометрия.* 1975. Т. 1. С. 23–29.
17. Дашевский В.Г. Конформационный анализ органических молекул. М.: Химия, 1982.
18. Маслов В.Г. // *Журн. структурной химии.* 1977. Т. 18. С. 414–415.
19. Розенгарт Е.В., Шестакова Н.Н., Прокатор С.О., Басова Н.Е. // *Журн. эволюц. биохим. и физиол.* 1995. Т. 31. С. 381–389.
20. Hypercube. Computational Chemistry. Publication HC40-00-03-00. Inc. HyperChem Manual, 1994. Chapter 12. P. 255–259.
21. Шестакова Н.Н., Розенгарт Е.В. // *Докл. АН.* 1996. Т. 346. С. 266–267.
22. Белинская Д.А., Шестакова Н.Н. // *Докл. АН.* 2004. Т. 396. С. 258–262.
23. Ines Primožič, Tomica Hrenar, Srđanka Tomić, Zlatko Meić. // *Croatica Chemica Acta.* 2003. V. 76. P. 93–99.

Theoretical Conformational Analysis in the Determination of Productive Conformations of Substrates for Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase

D. A. Belinskaya[#] and N. N. Shestakova

[#]Phone: +7 (812) 225-7563; e-mail: d_belinskaya@mail.ru
 Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
 Russian Academy of Sciences, pr. Morisa Toreza 44, St. Petersburg, 194223 Russia

All the equilibrium conformations of 34 analogues of acetylcholine (ACh) with the general formula R–C(O)O–Alk–N⁺(CH₃)₃ are calculated by the method of molecular mechanics. In the series R–C(O)O–(CH₂)₂–N⁺(CH₃)₃, a reliable correlation is found between the molecular volume of the substrate and the rate of its hydrolysis by acetylcholinesterase (AChE); the absence of such a correlation is demonstrated for butyrylcholinesterase (BChE). Theoretical conformational analysis confirms that the completely extended *tt* conformation of ACh is productive for the hydrolysis by AChE, which agrees with the results of X-ray analysis of AChE. AChE is shown to hydrolyze only those substrates that form equilibrium conformers compatible in the mutual arrangement of trimethylammonium group, carbonyl carbon, and carbonyl oxygen with the *tt* conformation of ACh; in this case, the rate of substrate hydrolysis depends on the total population of these conformers. A reliable correlation was found between the population of the semifolded (*tg*[–]) conformation of the choline moiety of substrate molecules and the rate of their BChE hydrolysis. In a series of CH₃–C(O)O–Alk–N⁺(CH₃)₃, the rate of BChE hydrolysis is demonstrated to depend on the total population of conformations compatible in the mutual arrangement of functionally important atoms with the *tg*[–] conformation of ACh. The *tg*[–] conformation of ACh is concluded to be productive for BChE hydrolysis. Similar orientations of the substrate molecules relative to the catalytic triads of both AChE and BChE are proven to coincide upon the substrate molecule sorption in their active sites. It is hypothesized that the sorption stage is rate-limiting in cholinesterase hydrolysis and the enzyme hydrolyzes the ACh molecule in its energetically favorable conformation. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: acetylcholine, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, productive sorption, structure–function relationships, theoretical conformational analysis