

Izvirni znanstveni članek ■

## Encimska kinetika in molekularno modeliranje se dopolnjujeta pri proučevanju reakcijskih mehanizmov

## Enzyme kinetics and molecular modeling complement each other at study of reaction mechanisms

### Jure Stojan

**Izvleček.** Kinetika holinesteraz je zelo zapletena in kaže več odstopanj od klasične Michaelis-Mentenove hiperbole. Zato smo želeli uskladiti rezultate kinetičnih meritev z znanimi kristalografskimi podatki in tako predlagati reakcijsko shemo hidrolitične pretvorbe acetiltioholina - umetnega kromogenega substrata. S pomočjo molekularnega modeliranja smo prikazali pomembne vmesne produkte v reakcijskem mehanizmu in s steričnim oviranjem deacetilacije razložili inhibicijo holinesteraze s prebitkom substrata.

**Abstract.** The kinetics of cholinesterases is complex and show several deviations from classical Micaelis-Menten hyperbola. Therefore, we tried to correlate the results of kinetic measurements with available crystallographic data and suggest an appropriate reaction scheme for the hydrolysis of acetylthiocholine - an artificial chromogenic substrate. By means of molecular modeling we anticipated important reaction intermediates and suggested steric hindrance of deacetylation as a basis for the inhibition by the excess of substrate.

■ **Infor Med Slov:** 2006; 11(1): 60-65

---

Institucija avtorja: Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija.

Kontaktna oseba: Jure Stojan, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija. email: [stojan@mf.uni-lj.si](mailto:stojan@mf.uni-lj.si).

## Uvod

Encimska kinetika poskuša s proučevanjem hitrosti katalitične pretvorbe substrata ugotoviti mehanizem encimskega delovanja to je, razjasniti dogodke v poteku reakcije na molekularni ravni. Matematične osnove zapletenih algoritmov za analizo kinetičnih podatkov v encimatiki so že dolgo znane. Vendar pa je njihov prenos v praktično uporabo, zaradi izredne računske zahtevnosti, postal mogoč šele v zadnjem desetletju. Ne le regresijske metode za direktno prilagajanje parametrov eksplisitnih enačb za hitrost ali časovni potek encimskih reakcij, ampak tudi reševanje zapletenih sistemov diferencialnih enačb in prilagajanje njihovih parametrov je vse bolj dosegljivo.<sup>1</sup> Toda narava kinetičnih podatkov v encimatiki je taka, da njihova interpretacija ni enolična, kar pomeni, da pravega izmed konkurenčnih reakcijskih mehanizmov ni mogoče izbrati z gotovostjo.<sup>2</sup> Pomembne odločitve v poteku kinetične analize se tako največkrat sprejemajo na osnovi nekinetičnih podatkov, ki vsakokrat nakažejo smer nadaljevanja. Tu pridejo v poštev različne kromatografske tehnike, s katerimi je mogoče identificirati vmesne reakcijske produkte in metodologija rekombinantne DNA, ki z usmerjeno mutagenezo razkrije specifično vlogo ključnih aminokislinskih ostankov. Najbolj cenjena pa je strukturna informacija, ki prihaja iz kristalografije z X-žarki oz. NMR analize bioloških molekul v raztopini. Uporaba naštetih tehnik je žal zelo draga, zato pa je s povečanjem moči in predvsem nizko ceno računalniške opreme postala dostopnejša še ena od metod encimskega proučevanja, t.j. molekularno modeliranje. Slednja temelji na izkušnjah obeh metod strukturne biologije in jih v obliki matematičnih algoritmov uporablja za napovedovanje 3D strukture novih ali dinamike delovanja že znanih bioloških molekul. Pri tem lahko izredno olajša pomembne odločitve v poteku kinetične analize in dodatno razkrije nove možne razlage.<sup>3</sup>

## Predstavitev problema

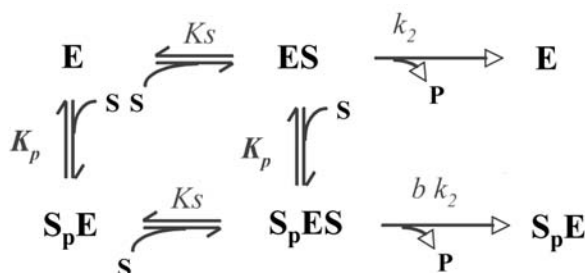
Acetilholinesteraza je encim, ki v večstopenjski reakciji hidrolitično razcepi neurotransmitter acetilholin in s tem prekine živčni impulz v holinergični sinapsi ali signal za kontrakcijo v žično-mišičnem stiku.<sup>4</sup> Encim, ki je eden najuspešnejših, pretvori tudi do 10000 substratnih molekul v sekundi. Molekula acetilholinesteraze je sestavljena iz več kot 530 aminokislinskih ostankov in sodi v skupino  $\alpha$ - $\beta$  hidrolaz z globoko ugreznjenim aktivnim centrom. Pri katalizi kemično sedelujejo stranske verige Ser-His-Glu triade, in sicer kot sistem za prenos nabojev ter večje število hidrofobnih ostankov v steni lijaka aktivnega mesta (glej sliko 5). Kemični mehanizem hidrolitične pretvorbe substrata poteka po principih kislinsko-bazne in kovalentne katalize, seveda po predhodni prilagoditvi substrata na dnu aktivnega mesta. Kinetika te reakcije je zelo nenavadna in po dobrih 50 letih intenzivnega proučevanja še vedno v mnogih pogledih nerazjasnjena. Več kot 70 znanih kristalnih struktur petih različnih holinesteraz je sliko precej izostrilo, vendar predvsem v interakcijah z inhibitorji in manj pri reakciji s substratom.<sup>5</sup>

## Kinetika holinesteraz

Odvisnost hitrosti od koncentracije substrata pri holinesterazah ni hiperbolična. Predvsem pri visokih koncentracijah substrata so encimi bolj ali manj popolnoma inhibirani, kar so že zelo zgodaj razlagali kot medsebojno tekmovanje molekul substrata. Predvideli so različne funkcionalne predele aktivnega centra, kamor se hkrati lahko vežeta dve substratni molekuli.

Slika 1 prikazuje Kinetični model po Webb-u<sup>6</sup> iz leta 1963. E je prosti encim, S substrat, P produkti, ES je kompleks encim-substrat, ko je substrat vezan v aktivnem centru, SpE je kompleks encim-substrat, ko je substrat vezan na perifernem mestu in SpES kompleks z zasedenima obema vezalnima mestoma; Ks je disociacijska konstanta za vezavo substrata v aktivni center, Kp za vezavo na

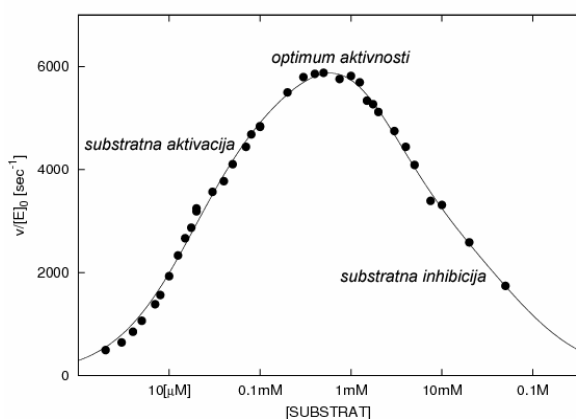
periferno mesto,  $k_2$  je hitrostna konstanta prvega reda za pretvorbo substrata v produkte in  $b$  proporcionalnostni faktor.



**Slika 1** Kinetični model po Webb-u.<sup>6</sup>

Ko smo pred leti ugotovili, da je večina holinesteraz, naravnih in specifično mutiranih, pri srednjih koncentracijah substrata precej aktivnejša kot predvideva Michaelis-Mentenova kinetika, je bilo potrebno revidirati kinetične modele in s tem tudi razumevanje molekulskega mehanizma reakcije.<sup>3</sup>

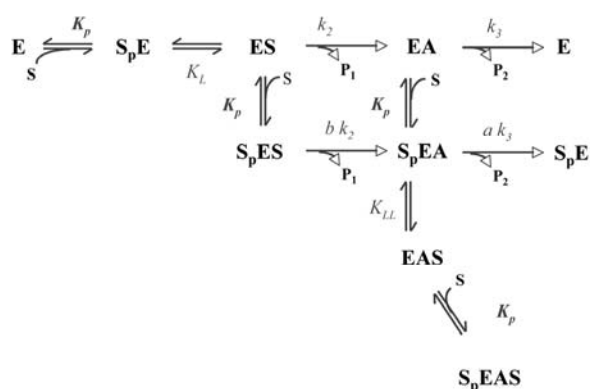
Tipična odvisnost acetilholinesterazne aktivnosti ( $v_0/[E_T]$ ) od koncentracije substrata ( $[S]$ ) je prikazana na sliki 2.



**Slika 2** Aktivnost acetilholinesteraze iz Električne jegulje v odvisnosti od koncentracije substrata acetiltioholina.

Ena od razširitev reakcijske sheme holinesteraz je kinetični model, ki predvideva sočasno vezavo dveh substratnih molekul na prosti in acetilirani encim ter aktivacijo in inhibicijo v odvisnosti od

koncentracije substrata, kot so ga predlagali Stojan in sod.<sup>7</sup> (slika 3). Pomen simbolov je analogen kot pri Webb-ovem modelu; kompleksi, ki vsebujejo 'A' predstavljajo kovalentne vmesne reakcijske produkte z acetiliranim Ser200;  $k_2$  je hitrostna konstanta prvega reda za acetilacijo in  $k_3$  hitrostna konstanta pseudo prvega reda za deacetilacijo.



**Slika 3** Kinetični model, kot so ga predlagali Stojan in sod.<sup>7</sup>

Za pomoč pri konstrukciji tega in podobnih modelov si pomagamo z molekularnim modeliranjem dogodkov med interakcijo holinesteraze s substratom.

## Metodologija

Za izdelavo molekularnih modelov nekaterih pomembnih reakcijskih intermediatov v poteku hidrolize acetiltioholina, t.j. analoga naravnega substrata, ki se uporablja za rutinsko zasledovanje holinesteraznih aktivnosti,<sup>8</sup> smo postavili nekaj izhodiščnih predpostavk: a/ ker se struktura encima v prisotnosti množice različnih inhibitorjev v razrešenih 3D strukturah praktično ne spreminja, smo v celotnem poteku grajenja molekularnih modelov fiksirali C $\alpha$  okostje polipeptidne verige; b/ za kandidatno področje, kjer se verjetno nahajajo substratne molekule, smo izbrali prostor v aktivnem centru, kjer se nahajajo vezani inhibitorji; c/ prilagajanje substratnih molekul v kandidatno področje mora biti tako, da zahteva čim manj spreminjanja položaja stranskih

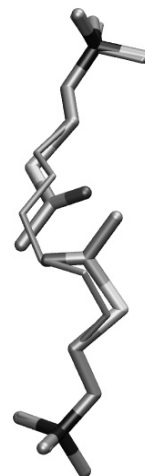
verig; d/ vmesni produkti, ki so kinetično predvidljivi morajo biti sterično možni; e/ manj znanstven, a zelo pomemben kriterij je estetska dopadljivost končnega izdelka.

Obstoj nekaterih intermediatov v poteku reakcije je očitno in ga je mogoče predvideti na osnovi sorodnih kristalografskih podatkov: n. pr. acetiliran serin v aktivnem mestu je analogen fosforiliranemu ali karbamoiliranemu serinu (Ser200) v kristalnih strukturah kovalentnih kompleksov z organofosfati (PDB koda 1SOM) in karbamati (PDB koda 1OCE). Po drugi strani pa je glavni teoretični izziv, ki ga nakazujejo kinetični poskusi, popolnoma inhibiran encim v prisotnosti zelo visokih koncentracij substrata. V našem kinetičnem modelu lahko tako situacijo razložimo s popolnoma zasedenim, kar pomeni popolnoma blokiranim aktivnim centrom. V njem se nahajata dve substratni molekuli, ki reakcijo ustavita na stopnji acetiliranega encima.

Za manipulacijo makro- in substratnih molekul smo uporabljali: WHAT IF, program za molekularno modeliranje in načrtovanje zdravil,<sup>9</sup> Gaussian 03, paket programov za ab initio računanje strukture malih molekul, CHARMM (Chemistry at HARvard Molecular Mechanics) program za makromolekularne simulacije, oprimizacije in dinamiko,<sup>10</sup> Molden, program za vizualizacijo molekulske in elektronske strukture<sup>11</sup> ter Swiss-PdbViewer za prikazovanje in strukturno poravnavanje makro- in substratnih molekul.<sup>12</sup>

Tipičen postopek modeliranja kompleksa med acetiliranim encimom in dvema substratnima molekulama je potekal takole: substratno molekulo acetiltioholona smo zgradili s programom Molden in jo z Gaussian 03 ab initio optimizirali v vakuumu (pri optimizaciji je bil uporabljen 6-31g\* bazni set). Geometrijo in naboje vseh 26 atomov smo uporabili pri izdelavi seta CHARMM-ovih parametrov. Podobna obravnava očetne kisline in acetilatnega ostanka ni bila potrebna, saj je set parametrov že v CHARMM-ovi bazi. Kot izhodiščno strukturo za modeliranje položaja acetiltioholinskih molekul smo uporabili kompleks vretenčarske acetilholinesteraze iz ribe *Torpedo*

*californica* (pacifiški električni skat) z dvopolnim inhibitorjem dekametonijem, PDB koda 1ACL. Struktura dekametonija namreč ustreza velikosti dveh acetilholinskih molekul, če bi le-ti bili med seboj povezani z metilnima skupinama acetatov (slika 4).

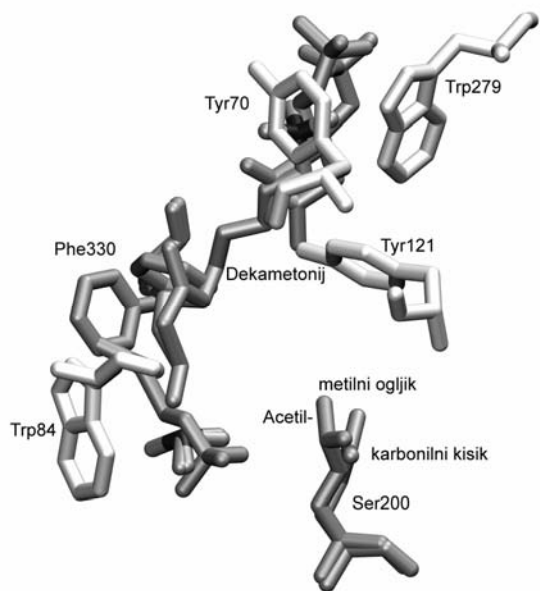


**Slika 4** Začetna poravnava dveh molekul substrata na konformacijo dekametonija (oranžno) iz strukture kompleksa z acetilholinesterazo (PDB koda 1ACL).

Za prilagajanje 4 težkih atomov tetrametilamino skupine v acetiltioholinu na obe ustrezni skupini dekametonija smo uporabili 'suppos' ukaz v programu Whatif. Izhodiščne koordinate acetilne skupine smo po analognem postopku pridobili iz kristalne strukture istega encima v kompleksu s somanom, PDB koda 1SOM. V nadaljevanju smo s programom CHARMM strukturo najprej relaksirali in nato v več zaporednih dinamičnih simulacijah v skupni dolžini 500 pikosekund z vmesnimi korekcijami dokončali. Kot zadnjo stopnjo smo opravili še 50 korakov QMMM minimizacije popolnoma sproščene strukture z 2.5 Å debelim plaščem vode. Pri tej končni relaksaciji smo kvantno mehansko računali stranske verige obeh triptofanov (notranjega Trp84 in zunanjega Trp279), stransko verigo aktivnega serina (S200) z acetilno skupino in obe substratni molekuli, vsega skupaj 101 atom.

## Rezultat

Rezultat modeliranja je prikazan na sliki 5.



**Slika 5** Model dveh acetilholinskih molekul v aktivnem mestu acetilirane vretenčarske acetilholinesteraze.

Aminokislinski ostanki, s katerimi se povežeta na vhodu (zgoraj) in na dnu aktivnega centra (levo spodaj) obe acetilholinski molekuli so prikazani svetlejšje. Kation- $\pi$  interakcije med obema triptofanoma in pozitivno nabitima tetrametilamonijevima glavama substratov so najpomembnejše vezi, podobno kot pri vezavi dekametonija. Zaradi prisotnosti kovalentno vezanega acetata na serinu (desno spodaj), se tista acetilholinska molekula, ki je ujeta v notranjosti aktivnega centra (levo spodaj) ne more orientirati v položaj, ki bi omogočal nadaljevanje katalitične pretvorbe. Acetilirani serin, obe substratni molekuli in Phe330 so prikazani dvojno. V razrešeni kristalni strukturi acetilholinesteraze po vsrkavanju acetilthioholina v 500 mM koncentraciji (PDB koda 2C4H) je Phe330 orientiran vodoravno.<sup>13</sup> Edina bistvena razlika med

modeliranim in kristalografsko ugotovljenim kompleksom je prav orientacija Phe330 in posledično položaj acetatne skupine notranje molekule substrata, ki se postavi na njegovo drugo stran. Opozorimo naj še na razdaljo med karbonilno skupino zunanje substratne molekule (v bližini Trp279), ki tako v modelu kakor tudi v razrešeni kristalni strukturi, po razdalji sodeč, tvori vodikovo vez s hidroksilno skupino Tyr121.

## Razprava

Molekularno modeliranje in vizualizacija dogodkov med potekom encimske reakcije sta tako teoretično kot praktično v veliko pomoč pri razjasnitvi molekulskega mehanizma proučevane reakcije. To še posebej velja v primeru, ko molekularno modeliranje kombiniramo z analizo kinetičnih podatkov in drugimi nekinetičnimi študijami. Uporabljamo ga lahko na več nivojih: vizualizacija potencialnih reakcijskih kompleksov nam odpira nove ideje in možne interpretacije, dinamične simulacije in kvantno-mehanski izračuni pa učinkovito preverjajo hipoteze oziroma privedejo do novih, zanesljivih informacij.

Primer vizualizacije intermediata holinesterazne reakcije, ko je encim popolnoma blokiran, ne kaže le ujemanja z interpretacijo natančne kinetične analize, ampak tudi to, da je mogoče z relativno preprostim in poceni pristopom, v razmeroma kratkem času (2-3 tedne s 4 AMD64 procesorji), s precejšno gotovostjo napovedati reakcijske dogodke. Seveda se velikokrat pojavljajo kritike, da so taki modeli le slabe ideje, ki nimajo dosti zveze z resničnostjo in da šele razrešitev kristalne strukture postavi stvari na pravo mesto. Do neke mere je to lahko res, a kadar je molekulske modele mogoče razviti po zgoraj naštetih kriterijih, je rezultat mnogo bližje resnici kot špekulaciji. Slednje se je pokazalo tudi v našem primeru, ko dve substratni molekuli in molekula enega od produktov popolnoma blokirajo aktivni center acetilholinesteraze. Kaže, da je substratno inhibicijo vretenčarske acetilholinesteraze resnično mogoče pripisati veliki gneči substratnih

molekul v aktivnem centru. Molekulski model, ki je bil izdelan v skladu z interpretacijo kinetičnih podatkov podpira to idejo, saj sterične lastnosti substratov in produktov dopuščajo takšno razlago. Dokončno veljavo modelu pa daje izredno ujemanje z nedavno razrešeno kristalno strukturo encima v prisotnosti 500 mM koncentracije acetiltioholina.<sup>13</sup>

### Literatura

1. Stojan J: Analysis of progress curves in an acetylcholinesterase reaction: a numerical integration treatment. *J Chem Inf Comput Sci* 1997; 37: 1025-7.
2. Stojan J: Rational Polynomial Equation Helps to Select Among Homeomorphic Kinetic Models for Cholinesterase Reaction Mechanism. *Chem Biol Interact* 2005; 157-158, 173-179.
3. Stojan J, Marcel V, Estrada-Mondaca S, et al.: A putative kinetic model for substrate metabolisation by *Drosophila* acetylcholinesterase. *Febs Lett* 1998; 440: 85-8.
4. Massoulie J, Pezzementi L, Bon S, et al.: Molecular and cellular biology of cholinesterases, *Prog. Neurobiol.* 1993; 41: 31-91.
5. Sussman JL, Harel M, Frolow F, et al.: Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein, *Science* 1991; 253: 872-879.
6. Webb JL: *Enzyme and metabolic inhibitors, general principles of inhibition.* New York, Academic Press 1963; 118.
7. Stojan J, Brochier L, Alies C, et al.: Inhibition of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase by high concentrations of substrate. *Eur J Biochem* 2004; 271: 1364-71.
8. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961; 7: 88-95.
9. Vriend G: WHAT IF: A molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* 1990; 8: 52-56.
10. Brooks BR, Brucoleri RE, Olafson BD, et al.: CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J. Comp. Chem.* 1983; 4: 187.
11. Schaftenaar G, Noordik JH: Molden: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures, *J. Comput.-Aided Mol. Design* 2000; 14: 123-134.
12. Guex N, Peitsch MC: SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997; 18: 2714-2723.
13. Colletier JP, Fournier D, Greenblatt HM, et al.: Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *The EMBO Journal* advance online publication 2006; doi: 10.1038/sj.emboj.7601175.