

На правах рукописи

ШМУРАК

Владимир Игоревич

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СВЯЗЫВАЮЩЕЙ И ЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ
СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА, БЫКА И КРЫСЫ**

03.01.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург, 2018 г.

Работа выполнена в лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии
ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека»
Федерального медико-биологического агентства

Научный руководитель: **Гончаров Николай Васильевич**
доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник НИИ гигиены, профпатологии и
экологии человека ФМБА России;
зав. лабораторией Института эволюционной физиологии и
биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

Официальные оппоненты: **Орехов Александр Николаевич**
доктор биологических наук, профессор,
зав. лабораторией НИИ общей патологии и патофизиологии;
директор НИИ атеросклероза (Сколково).

Стефанов Василий Евгеньевич
кандидат биологических наук, доцент,
зав. кафедрой биохимии биологического факультета
Санкт-Петербургского государственного университета.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Институт экспериментальной медицины»

Защита состоится 21 июня 2018 г. в _____ на заседании Диссертационного совета
Д212.232.10 на базе ФГБОУ ВО СПбГУ по адресу: 199034, Санкт-Петербург,
Университетская наб., 7/9, ауд. 90. Тел.: (812) 328-97-41, e-mail: DSphysiol@bio.spbu.ru
С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. М. Горького ФГБОУ ВО
СПбГУ по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9 и на сайте СПбГУ:
<https://disser.spbu.ru/>

Автореферат разослан _____ апреля 2018 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

Н.П. Алексеев

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В токсикологических и фармакологических исследованиях важно понимать специфику видовых различий экспериментальных животных для адекватной интерпретации полученных результатов при проведении доклинических и клинических испытаний. Применительно к изучению фосфорорганических соединений (ФОС), одним из принципиальных особенностей крови грызунов является наличие в ней карбоксилэстераз, тогда как в крови человека функции карбоксилэстераз выполняет альбумин (*Li et al.*, 2005).

Альбумин - это главный белок крови млекопитающих, где его концентрация составляет 500-700 мкМ. Наряду с липопротеинами, альбумин является одним из важнейших биомаркеров, определяющих повышенную вероятность летального исхода пациентов вне зависимости от пола, возраста и характера их заболевания (*Fischer et al.*, 2014; *Orekhov et al.*, 2014). Молекула альбумина не покрыта углеводной оболочкой и может связывать самые разные молекулы и атомы: воду и катионы металлов (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Pt^{2+} , Au^{+}), свободные жирные кислоты (СЖК) и жирорастворимые гормоны, неконъюгированный билирубин, соли желчных кислот, трансферрин, окись азота, аспирин и другие соединения (*Fasano et al.*, 2005; *Sand et al.*, 2015). Связывая лекарства и токсические вещества, альбумин в значительной степени определяет их фармако- и токсикокинетику. Связывание происходит по двум первичным сайтам и нескольким вторичным. Так, для СЖК имеется 7 сайтов связывания, причем связавшиеся жирные кислоты изменяют полярность и объем сайтов связывания лекарственных препаратов (*Ghuman et al.*, 2005). Трехмерная структура альбумина сыворотки крови человека (ЧСА) была исследована лишь в конце XX в., аналогичная структура бычьего сывороточного альбумина (БСА) получена в 2012 г., а структура крысиного альбумина (КСА) не получена до сих пор. Молекула альбумина образована одной полипептидной цепью, состоящей из 585, 584 и 583 аминокислотных остатков (а.о.) для ЧСА, КСА, БСА, соответственно (*Majorek et al.*, 2012; *Consortium*, 2015; *Strauss et al.*, 1977). Структура альбумина консервативна для всех млекопитающих: молекула состоит из трех гомологичных доменов, каждый из которых состоит из десяти спиралей и может быть разделен на два субдомена, А и В, содержащих шесть и четыре спирали, соответственно; эти два субдомена соединены длинной петлей (*Vujacz*, 2012). Молекула альбумина человека и быка имеет 17 дисульфидных связей и один остаток Cys со свободной SH-группой (*Vujacz*, 2012; *Ghuman et al.*, 2005). В первичной последовательности КСА столько же остатков Cys, сколько в последовательности ЧСА и БСА, и они расположены в тех же позициях (*Strausberg et al.* 2006), поэтому есть основания предполагать, что КСА также имеет 17 дисульфидных связей и одиночный Cys в своей трехмерной структуре. Выравнивание первичных последовательностей а.о. молекул ЧСА, КСА и БСА с помощью Clustal Omega (*Sievers et al.*, 2011) показало, что наибольшей идентичностью обладают молекулы ЧСА и БСА – 75,6%. Идентичность первичной структуры ЧСА и КСА составляет 73,0%, а БСА и КСА — 69,9%. Если же сравнить непосредственно а.о. сайта Садлоу I (сайт Садлоу II у всех трёх видов альбумина консервативен), то здесь молекулы ЧСА и КСА обладают наибольшей идентичностью – 75%, в то время как БСА демонстрирует лишь 57% идентичности как с КСА, так и с ЧСА. Кроме того, у БСА преобладают замены лизиновых остатков на аргининовые в сайте Садлоу I

(Lys195→Arg195, Lys199→Arg199), что сказывается на его конфигурации, поскольку боковые цепи аргинина сильнее разветвлены. Трехмерная структура альбумина достаточно лабильна, так что при взаимодействии с молекулой альбумина разных веществ имеют место такие эффекты как кооперативность и аллостерическая модуляция, обычно присущие мультимерным белкам (*Ascenzi, Fasano, 2010*). Однако, в силу вышеуказанных различий первичных структур, по результатам исследования функциональных характеристик альбумина одного вида животных нельзя *a priori* утверждать, что альбумин другого вида будет обладать такими же характеристиками. Например, ЧСА при взаимодействии с жирными кислотами в растворе обладает высокой пластичностью и гибкостью, тогда как характеристики БСА в растворе по отношению к жирным кислотам не сильно отличаются от расчетных данных, полученных для его кристаллической структуры (*Reichenwallner, Hinderberger, 2013*).

В разные годы была показана эстеразная или псевдоэстеразная активность альбумина по отношению к α -нафтилацетату и *n*-нитрофенилацетату (НФА), эфирам жирных кислот, аспирину, глюкурониду кетопрофена, циклофосфамиду, эфирам никотиновой кислоты, октаноилгрелину, *o*-нитроацетанилиду и т.д. В токсикологии наибольший интерес представляет проблема (псевдо)эстеразной активности альбумина по отношению к ФОС (эфирам фосфорной кислоты) и особенно по отношению к высокотоксичным фосфорорганическим отравляющим веществам (ФОВ) – эфирам фосфоновой кислоты, к которым относятся зарин, зоман, V-газы. Установлено два сайта образования ковалентных аддуктов ФОВ с ЧСА - Tyr411 и Tyr150 (*Li et al., 2008; John et al., 2010*). Однако, несмотря на огромные возможности современных аналитических методов, имеющиеся данные не позволяют однозначно решить проблему наличия или отсутствия у альбумина эстеразной и других типов ферментативной активности. До сих пор механизмы взаимодействия различных эфиров и других соединений с альбумином остаются нераскрытыми, а межвидовые исследования вообще не проводились. Имеется лишь одна работа, в которой применялись методы молекулярного моделирования для изучения процесса взаимодействия ФОВ (зомана) с альбумином (*Li et al., 2008*). При этом докинг проводили только в сайте связывания Tyr411. Метод молекулярной динамики (*McCammon et al., 1977; Стефанов и др., 2012*) в этой работе не применялся.

Цель настоящей работы - биохимическими методами *in vitro* и методами молекулярного моделирования *in silico* исследовать связывающую и эстеразную активность сывороточного альбумина человека (*Homo sapiens*), быка (*Bos taurus taurus*) и крысы (*Rattus norvegicus*).

Для достижения данной цели поставлены и решены следующие **задачи**:

- 1) определить биохимическими методами *in vitro* кинетические и равновесные характеристики взаимодействия ЧСА, БСА и КСА с *n*-нитрофенилацетатом;
- 2) определить биохимическими методами *in vitro* кинетические и равновесные характеристики взаимодействия ЧСА, БСА и КСА с параоксоном;
- 3) определить характеристики взаимодействия БСА и ЧСА с зоманом методами *in vitro* и *in silico*, установить сайты эстеразной активности альбумина;
- 4) исследовать с помощью методов молекулярного моделирования взаимодействие параоксона с возможными сайтами связывания ЧСА и БСА.

Положения диссертации, выносимые на защиту

- 1) Предложена схема и математическая модель для описания каталитического и стехиометрического взаимодействия альбумина с субстратами эстераз.
- 2) Функциональные характеристики ЧСА и КСА отличаются между собой в меньшей степени по сравнению с функциональными характеристиками БСА. Более консервативными являются БСА по отношению к КСА и ЧСА, а также сайт Садлоу II по отношению к сайту Садлоу I всех исследованных видов альбумина.
- 3) Эффективность фосфорилирования сайта Садлоу II всех трех видов альбумина при взаимодействии с параоксоном выше эффективности ацетилирования этого сайта при взаимодействии с *n*-нитрофенилацетатом.
- 4) Исследование взаимодействия альбумина с зоманом методом остаточного ингибирования ацетилхолинэстеразы позволяет оценить аффинность к двум сайтам альбумина.
- 5) Применение биохимических методов анализа в сочетании с методами молекулярного моделирования позволяет определить сайты и характер взаимодействия эфирных субстратов с альбумином.

Научная новизна. Впервые в рамках одного исследования проведен сравнительный анализ трех видов альбумина (БСА, ЧСА, КСА) с использованием биохимических методов в сочетании с методами молекулярного моделирования (молекулярный докинг и молекулярная динамика). Проведен сравнительный кинетический и ингибиторный анализ начальных скоростей гидролиза НФА на двух стадиях активности (предстационарное и стационарное состояния) БСА, ЧСА, КСА. Определены константы диссоциации и проведен анализ реципрокного влияния основных сайтов альбумина при взаимодействии с негидролизующими лигандами (варфарин, ибупрофен). Установлена высокая селективность ибупрофена к сайту Садлоу II и низкая селективность варфарина к сайту Садлоу I. Методами молекулярного моделирования впервые изучены процессы взаимодействия альбумина с НФА, параоксоном, стереоизомерами зомана, специфическими ингибиторами сайтов Садлоу I и II. Установлено, что ФОС могут продуктивно взаимодействовать с сайтом Садлоу I альбумина; помимо Tyr150 и Tyr411 ЧСА, с зоманом могут продуктивно взаимодействовать Ser193 и Lys402. При этом установлено, что только Р(-) изомеры зомана (обуславливающие его высокую токсичность) связываются с этими сайтами на расстоянии, достаточно близком для нуклеофильной атаки кислородом (азотом) фосфора зомана.

Теоретическое и практическое значение работы. Обнаруженные сходства и различия альбумина разных видов животных позволят точнее оценивать экспериментальные данные с учетом видовой специфики, что важно в свете задач трансляционной медицины, т.к. понимание особенностей фармако- и токсикокинетики многих соединений в организме грызунов требуется для адекватной интерпретации их кинетических закономерностей в организме человека. Так, с НФА и параоксоном в качестве субстрата установлено, что функциональные характеристики обоих сайтов Садлоу альбумина крысы и человека ближе между собой и существенно отличаются от характеристик бычьего альбумина. Отсюда следует, что в экспериментальных моделях *in vitro* необходимо использовать ЧСА, а не более дешевый и доступный БСА. Кроме того, учитывая наличие карбоксилэстеразы в плазме крови грызунов, в моделях *in vitro* и *in vivo*

с грызунами необходимо использовать ингибиторы карбоксилэстераз. Предложена схема и математическая модель для описания эстеразной активности альбумина, впервые проведен биохимический анализ функционирования двух сайтов альбумина в сочетании с анализом *in silico*. Результаты важны для развития методологии доклинических исследований фармпрепаратов. Сочетание методов теоретической и экспериментальной оценки (псевдо)эстеразной активности альбумина позволит найти способы направленного воздействия на определенные сайты или молекулу альбумина в целом лигандами природного и искусственного происхождения, повышая таким образом эффективность не только антидотной терапии, но и терапии различных заболеваний.

Апробация работы. Результаты исследований доложены на международной пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2011г.), на международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2011), на 11-й международной конференции по холинэстеразам (Казань, 2012), на 1-й международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Москва, 2010).

Личный вклад. Автор участвовал во всех экспериментах, представленных в данной работе, проводил статистическую обработку полученных результатов, участвовал в написании тезисов и статей, представлял результаты на конференциях. Ряд работ выполнен при участии сотрудников Института эволюционной физиологии и биохимии им.И.М.Сеченова РАН в рамках грантов РФФИ и РНФ, что нашло отражение в соответствующих публикациях.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 148 страницах машинописного текста, содержит 26 таблиц и 40 рисунков. Состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, 6 экспериментальных разделов с обсуждением и частными выводами, заключения и общих выводов. Библиография включает 11 русскоязычных и 200 англоязычных источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались реактивы: альбумины, свободные от жирных кислот (ЧСА, БСА, КСА), *n*-нитрофенилацетат (НФА), диэтил-4-нитрофениловый эфир фосфорной кислоты (параоксон), ДТНБ, TRIS, ацетилтиохолин (АТХ) - фирмы Sigma; фосфатный буфер (ФБ) – фирмы Биолот.

Определение эстеразной активности альбумина. Эстеразную активность альбумина по отношению к АТХ и БТХ определяли планшетным вариантом метода Элмана на спектрофотометрическом планшетном ридере Thermo Multiscan Ascent на длине волны 405 нм. Активность относительно НФА и параоксона определяли также спектрофотометрически (405 нм) по накоплению нитрофенола.

Определение активности альбумина по отношению к зоману. Проводили эксперимент по определению скорости гидролиза зомана БСА в зависимости от концентрации зомана в реакционной смеси. Маточный раствор зомана в концентрации 10 мг/мл готовили в ацетонитриле. Рабочие растворы зомана и раствор альбумина в концентрации 20 мг/мл готовили в ФБ в день эксперимента. Концентрации рабочих растворов зомана были в диапазоне от 2×10^{-4} до 6×10^{-3} мг/мл. Для учета спонтанного

гидролиза зомана для каждой концентрации зомана готовили контрольную пробу, где раствор альбумина заменяли эквивалентным объемом ФБ. Приготовленную пробу перемешивали и помещали в термостат на 37°C. Через 60 мин каждую исследуемую и контрольную пробу разводили в ФБ и определяли концентрацию зомана по остаточной активности АХЭ по методу Элмана. В опытной пробе определяли концентрацию «свободного» зомана, в контрольной пробе определяли концентрацию «общего» зомана. Скорость гидролиза зомана альбумином рассчитывали как разницу между концентрациями «общего» и «свободного» зомана деленную на 60 мин. Полученные данные вносили в программу GraphPad Prism, трансформировали в двойные обратные координаты, используя модели обработки данных по Скетчарду и по Лайнуиверу-Берку.

Математическая обработка данных. Данные сравнительного биохимического анализа предварительно обрабатывали в Microsoft Excel. Нелинейную и линейную аппроксимацию функций (методом наименьших квадратов), статистическую обработку данных и визуализацию результатов выполняли с помощью языка программирования Python (<http://www.python.org>) в среде Jupyter с установленным ядром IPython. Использовали следующие сторонние пакеты из научного стека: NumPy, Scipy, Matplotlib, Seaborn, Pandas и LmFit (Pérez, Granger, 2007; Van Der Walt et al., 2011; Pedregosa et al., 2011; Hunter, 2007; McKinney, 2010). В тексте и таблицах приводятся данные в виде $\bar{x} \pm SE$. Планки погрешностей на рисунках соответствуют стандартной ошибке.

Молекулярное моделирование. Трехмерные молекулы лигандов построены и минимизированы методом скорейшего спуска (Fletcher, Reeves, 1964) с помощью программы HyperChem 8.0 (Hypercube Inc., 1994). В качестве 3D модели белка использованы данные рентгеноструктурного анализа молекулы альбумина человека из базы данных белковых структур (Berman et al., 2000), код структуры 2bxd (Ghuman et al., 2005). Молекулы воды и лигандов были удалены из структуры. Затем молекула альбумина была минимизирована методом скорейшего спуска (Fletcher, Reeves 1964) с помощью программного пакета Gromacs (Berendsen et al., 1995). Заряды на атомах депротонированного тирозина были рассчитаны с помощью программы HyperChem 8.0 (Hypercube Inc., 1994) методом Ab Initio с использованием базиса STO-3G (Gani et al., 2008). Рассчитанные параметры были добавлены в библиотеки программ Autodock (Morris et al., 1998) и Gromacs (Berendsen et al., 1995), а затем использованы для процедур молекулярного докинга и молекулярной динамики. Докинг лигандов в центры связывания альбумина проводили с помощью программного пакета Autodock4.0 (Morris et al., 1998). Использован подход из работы (Li et al., 2008). В исследуемом центре связывания белка строили решетку аппроксимации размером 60 узлов в x-, y-, и z-направлении и с шагом 0.0375 нм. Значение свободной энергии связывания (ΔG) используется в программе Autodock как оценочная функция для поиска оптимальных конформаций. Энтальпийную составляющую свободной энергии рассчитывали как сумму энергий ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий, энергии водородных связей и десольватации. Энтропийный компонент оценивали исходя из числа «замороженных» вращающихся связей лиганда после связывания с белком. Константу диссоциации рассчитывали из полученного оценочного значения свободной энергии связывания: $K_d = \exp(\Delta G / (R * T))$ (Morris et al., 1998). Для поиска оптимальных конформаций комплекса альбумин-лиганд использовали ламарковский генетический алгоритм (Morris et al., 1998). Процедуру поиска

повторяли 50 раз для каждой пары белок-лиганд. Итоговые конформации комплексов, RMSD которых не превышал 0.05 нм, объединяли в кластеры и сортировали по возрастанию K_d комплекса. В итоге результатом докинга был набор из 3-6 наиболее вероятных конформаций. В каждую из этих конформаций сходится 6-18 запусков конформационного поиска. Для описания сайтов, которые потенциально могли бы отвечать за псевдоэстеразную или эстеразную активность альбумина, использовали кластер, соответствующий самой энергетически выгодной найденной конформации комплекса сайт-лиганд. K_d рассчитывали как среднее арифметическое значений, полученных в данном кластере. Погрешность оценивали методом Корнфельда. Конформации с минимальным K_d использовали как стартовые структуры для дальнейшей симуляции методом молекулярной динамики. Продуктивность всех отобранных конформаций (возможность атаки каталитической аминокислоты на ФОС) оценивали по расстоянию между гидроксильным атомом кислорода (для тирозинов и серинов) или N ζ -атомом (для лизинов) и атомом фосфора молекулы лиганда. Другие конформации, свободная энергия связывания которых выше (а значит и K_d больше), проверяли на «продуктивность». Конформационные изменения лиганд-ферментных комплексов во времени рассчитывали методом молекулярной динамики с помощью программного пакета GROMACS (Fletcher, Reeves, 1964). Комплексы, полученные методом молекулярного докинга, виртуально помещали в периодическую кубическую решетку, заполненную молекулами воды. Длина всех траекторий составляла 1000 пс, шаг интегрирования был принят равным 0.002 пс. Для описания молекул воды использовали модельный потенциал (Berendsen et al., 1981). Для поддержания температуры 300К и давления 1 бар применяли термостат и баростат Берендсена с временными константами 0.1 и 1 пс, соответственно (Berendsen et al., 1984; Bussi et al., 2009). Дальние электростатические взаимодействия рассчитывали методом Эвальда (Darden et al., 1993). Взаимодействия Леннард-Джонса не учитывали при межатомном расстоянии >1 нм. Длины связей поддерживали постоянными с помощью алгоритма LINCS (Hess et al., 1997). Расчету конформационных изменений методом молекулярной динамики предшествовала минимизация энергии системы методом скорейшего спуска (Sant'Anna et al., 2006) и релаксация системы длиной 10 пс.

Ошибка метода. Применяемый в данной работе подход (ламарковский генетический алгоритм) позволяет исследовать конформационное пространство лиганда внутри сайта связывания, его результатом является 50 (по заданному нами числу запусков) возможных конформаций комплекса сайт-лиганд. Конформации, разность RMSD которых не превышает 0.05 нм, объединяются в кластер, т.е. считаются одним и тем же энергетическим минимумом (можно считать, что с учетом погрешности минимизации это одна и та же точка, в которую сходится решение). Результатом докинга является набор из нескольких (3-6) минимумов, т.е. из нескольких наиболее вероятных конформаций. В каждом из этих минимумов сходится примерно 6-18 запусков минимизации, т.е. в каждом кластере, соответствующем одному минимуму, есть 6-18 близких конформаций. Указывая K_d для найденной самой выгодной конформации, использовали среднее арифметическое всех значений, полученных в данном кластере. Максимальный разброс значений в кластере составил 7% от найденного среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительное биохимическое исследование связывающей и эстеразной активности ЧСА, БСА и КСА.

Математические модели кинетики сайтов Садлоу I и II. Для анализа механизма реакций с альбумином и количественной оценки кинетических параметров применяли модель расщепления НФА альбумином (*Ascenzi et al.*, 2015), модель расщепления НФА химотрипсином (*Bender et al.*, 1967), модель гидролиза НФА липазой (*De Caro et al.*, 1986), модель ингибирования холинэстераз ФОС (*Main*, 1964). На первом этапе взаимодействия альбумина с субстратом (схема 1) происходит его адсорбция в сайте Садлоу II (ES), быстрое высвобождение продукта *n*-нитрофенола (P₁), отмечаемое как «всплеск» активности, и необратимое ацетилирование Tyr411 (EA). На втором этапе субстрат связывается с альбумином в сайте Садлоу I, где происходит его гидролиз до ацила (P₂) и *n*-нитрофенола (P₁). В то же время, схема (1) применима для описания взаимодействия субстрата с каждым из двух (или более) сайтов в отдельности.

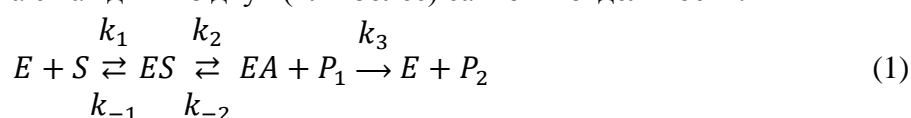


Схема 1. Взаимодействие между альбумином и субстратом (НФА или параоксоном). S – субстрат, P₁ – *n*-нитрофенол, P₂ – ацильная группа.

Предстационарное состояние (кинетика Садлоу II). Амплитуду фазы «всплеска», на которой происходит быстрая реакция в сайте Садлоу II, обозначим α . Константа скорости реакции – k_{obs} . Выход продукта представляет собой реакцию (псевдо)первого порядка в течение почти 95% времени фазы «всплеска». Константа скорости деацетилирования k_3 по меньшей мере в 100 раз ниже константы скорости ацетилирования тирозина, полученной даже на самых низких концентрациях субстрата.

Использованные нами аппроксимирующие функции имеют вид:

$$[P_1] = \alpha \cdot [E_0] \cdot (1 - e^{-k_{obs}t}) \quad (2)$$

где:

$$\alpha = \left[\frac{k_2 \cdot [S]}{(k_2 + k_3) \cdot (K_m + [S])} \right]^2 \quad (3) \quad k_{obs} = \left(\frac{k_2 \cdot [S]}{K_s + [S]} \right) + k_3 \quad (4)$$

Преобразуем уравнение 4 по методу двойных обратных величин. Скорость деацетилирования сайта Садлоу II очень низка, поэтому константой k_3 можно пренебречь:

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{k_2} + \frac{K_s}{k_2} \cdot \frac{1}{[S_0]} \quad (5)$$

Стационарное состояние (кинетика Садлоу I) описывается уравнением:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{k_3[E_0]} + \frac{K_m^{app}}{k_3[E_0][S_0]} \quad (6)$$

Уравнения 5 и 6 имеют форму $y = b + ax$ и могут быть использованы для линейного регрессионного анализа. Определив наклон прямой и её пересечение с осью ординат, мы найдём k_2 , k_3 , K_s и K_m^{app} .

Исследование взаимодействия НФА с альбумином. Сайт Садлоу I КСА обладает наибольшей каталитической эффективностью по отношению к НФА, которая в 2 и 5,5 раз выше по сравнению с ЧСА и БСА, соответственно (табл.1). Эти различия обусловлены

неодинаковым средством сайта Садлоу I к субстрату, т.к. число оборотов у них одинаково. Различия субстратных констант КСА и ЧСА в сайте Садлоу II незначительны, тогда как у БСА величина K_s в 2 раза ниже. Это свидетельствует о консервативности сайта Садлоу II в сравнении с сайтом Садлоу I всех исследованных видов альбумина, а также БСА в сравнении с КСА и ЧСА.

Табл. 1. Характеристики эстеразной активности альбумина с НФА в качестве субстрата.

	ЧСА	БСА	КСА
Садлоу II (предстадионарный режим)			
k_2 (с ⁻¹)	0.48 ± 0.1	0.48 ± 0.01	0.47 ± 0.01
$K_s = k_{-1}/k_1$ (мкМ)	5.92 ± 0.99	2.77 ± 1.1	6.28 ± 0.67
k_2/K_s (мм ⁻¹ × с ⁻¹)	81 ± 8	173 ± 21	75 ± 5
Садлоу I (стадионарный режим)			
k_3 (с ⁻¹)	0.020 ± 0.001	0.020 ± 0.003	0.019 ± 0.003
K_m^{app} (мкМ)	761.9 ± 50.5	2208.3 ± 73.8	396.7 ± 95.1
k_3/K_m^{app} (мм ⁻¹ × с ⁻¹)	0.026 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.051 ± 0.008

Исследование ингибирующего действия ибупрофена и варфарина с НФА в качестве субстрата. В сайте Садлоу II средство к ибупрофену максимально у КСА, в 2 раза меньше у ЧСА и в 4 раза - у БСА (табл. 2). Варфарин не влиял на Садлоу II. Выявлено аллостерическое ингибирующее влияние ибупрофена на сайт Садлоу I, максимальное (по бимолекулярной константе реакции k_i/K_i) для КСА, на четверть меньше для ЧСА и в 11 раз - для БСА (табл. 2). Влияние варфарина максимально на Садлоу I БСА, в 3,5 раза меньше - на ЧСА и в 5,5 раз меньше - на КСА. Ингибиторный анализ также свидетельствует о более близких характеристиках КСА и ЧСА по сравнению с БСА.

Табл. 2. Ингибирующее влияния ибупрофена и варфарина с НФА в качестве субстрата. Концентрации (мкМ): альбумин - 10, НФА - 100 мкМ, ингибиторы - 5, 10, 20, 30 мкМ.

	ЧСА	БСА	КСА
Садлоу II (предстадионарный режим)			
Ибупрофен: K_i, мкМ	88.3 ± 17.68	172.1 ± 28.9	45.9 ± 6.8
Садлоу I (стадионарный режим)			
Ибупрофен: K_i, мкМ	2.6 ± 0.9	19.9 ± 1.5	4.8 ± 0,6
k_i , с ⁻¹	0.0008 ± 0.0001	0.0010 ± 0.00001	0.0027 ± 0.0008
k_i / K_i , мм ⁻¹ с ⁻¹	0.428 ± 0.118	0.050 ± 0.012	0.561 ± 0.131
Варфарин: K_i, мкМ	73.3 ± 2.9	7.0 ± 0.8	12.4 ± 0.8
k_i , с ⁻¹	0.0043 ± 0.0018	0.0014 ± 0.0003	0.0005 ± 0.00004
k_i / K_i , мм ⁻¹ с ⁻¹	0.058 ± 0.022	0.197 ± 0.014	0.036 ± 0.0023

Сравнительное исследование связывающей и эстеразной активности ЧСА, БСА и КСА с параоксоном в качестве субстрата.

Сайт Садлоу I. По отношению к параоксону наибольшей каталитической эффективностью обладает БСА, который по показателю k_3/K_m^{app} в 4,1 и 5,3 раза активнее КСА и ЧСА, соответственно (табл. 3). Каталитическая эффективность сайта Садлоу I БСА по отношению к параоксону примерно в 4 раза меньше, чем по отношению к НФА; для КСА и ЧСА эти отличия составляют 100 и 65 раз, соответственно. Функциональные характеристики Садлоу I КСА и ЧСА ближе между собой, что мы наблюдали также и с

НФА в качестве субстрата. Однако, по сравнению с НФА, важнейшее отличие состоит в том, что при сопоставимых значениях K_m разница в скорости деацилирования составляет десятки раз. Относительно высокое сродство к параоксону при небольшой скорости ацилирования и деацилирования означает, что сайт Садлоу I служит исключительно средством транспортировки параоксона.

Сайт Садлоу II. Как и в случае с НФА, сайт Садлоу II имеет более высокое сродство к параоксону по сравнению с Садлоу I (табл. 3). При этом аффинность Садлоу II всех трех видов альбумина к параоксону выше аффинности к НФА примерно в 1.5, 2.5 и 3 раза для ЧСА, КСА и БСА, соответственно. Константа скорости фосфорилирования k_2 практически не отличается от константы скорости ацетилирования с НФА в качестве субстрата. Расчет бимолекулярной константы реакции ингибирования (k_2/K_s) даёт основания заключить, что сайт Садлоу II БСА существенно быстрее образует ковалентные связи с диэтилфосфатным остатком по сравнению с ЧСА и КСА (в 4 и 2,5 раза). Т.е. фосфорилирование сайта Садлоу II всех трех видов альбумина при взаимодействии с параоксоном происходит быстрее ацетилирования.

Таблица 3. Кинетические характеристики активности трех видов альбумина по отношению к параоксону.

	ЧСА	БСА	КСА
Садлоу II (предстационарный режим)			
k_2 (с ⁻¹)	0.43 ± 0.01	0.49 ± 0.02	0.48 ± 0.01
$K_s = k_{-1}/k_1$ (мкМ)	3.99 ± 1.7	0.86 ± 0.1	2.41 ± 0.8
k_2/K_s (мм ⁻¹ × с ⁻¹)	150 ± 60	580 ± 60	230 ± 80
k_3 (×10 ⁻⁶ с ⁻¹)	0.82 ± 0.15	0.75 ± 0.21	0.50 ± 0.25
Садлоу I (стационарный режим)			
k_3 (×10 ⁻⁶ с ⁻¹)	320 ± 10	960 ± 60	720 ± 70
K_m^{app} (мкМ)	801.6 ± 7.8	447.7 ± 34.5	1361.6 ± 165.3
k_3/K_m^{app} (мм ⁻¹ с ⁻¹)	0.00040 ± 0.00001	0.00216 ± 0.00029	0.00052 ± 0.00002

Влияние ингибиторов на взаимодействие альбумина с параоксоном. Ибупрофен ингибировал фосфотриэстеразную реакцию в сайте Садлоу I (табл.4). Максимальный эффект выявлен для ЧСА, меньше на 20% для КСА и в 2,8 раз для БСА. Поскольку ибупрофен не способен напрямую взаимодействовать с сайтом Садлоу I (*Ascenzi et al.*, 2006), очевидно, он выступает в роли аллостерического регулятора. Определен *неконкурентный* тип ингибирования ибупрофеном параоксоназной реакции в Садлоу I (рис.1). Ингибирующего влияния ибупрофена на сайт Садлоу II выявлено не было, что объясняется высоким сродством параоксона к данному сайту и более высокой липофильностью ибупрофена по сравнению с параоксоном (LogP=3.6 vs 2.0).

Варфарин. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии влияния варфарина на стационарную фазу гидролиза параоксона, но в то же время незначительно и нелинейно (т.е. примерно в одинаковой степени все концентрации) варфарин подавляет фазу всплеска гидролитической активности. Очевидно, медленный гидролиз параоксона осуществляется в сайте, «неподконтрольном» варфарину, в т.ч. в сайте Садлоу II. Кроме того, как и в случае с ибупрофеном, в условиях работы с высокими концентрациями имеет значение высокая липофильность варфарина (LogP=4). Данные ингибиторного анализа с субстратом параоксоном подтверждают вывод о более близких функциональных характеристиках КСА и ЧСА по сравнению с БСА.

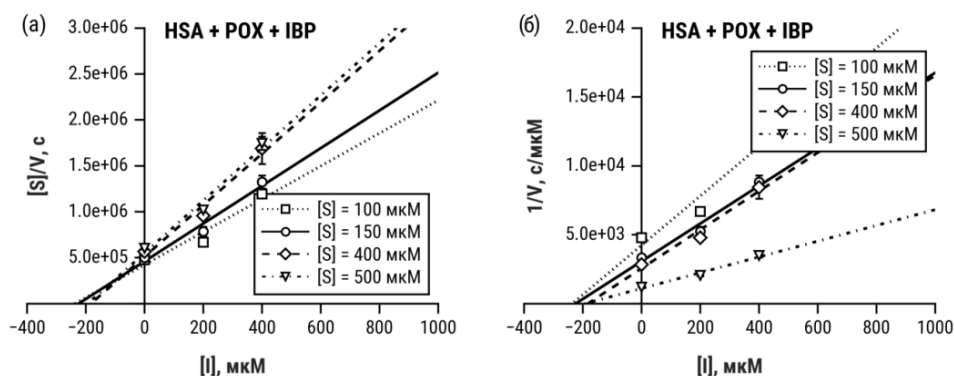


Рисунок 1. Неконкурентное ингибирование ибупрофеном параоксоназной активности сайта Садлоу I ЧСА: по Диксону (а), по Корниш-Боудену (б). Концентрация альбумина $[E_0]$ 375 мкМ, ингибитора – 200 и 400 мкМ.

Таблица 4. Влияние ибупрофена на сайт Садлоу I различных видов альбумина при использовании параоксона в качестве субстрата

Ингибитор / K_i , мкМ	ЧСА	БСА	КСА
Садлоу I (стационарный режим)			
Ибупрофен	$250,2 \pm 19,9$	$686,9 \pm 74,3$	$300,4 \pm 12,4$

Исследование связывающей и эстеразной активности альбумина с зоманом в качестве субстрата.

Снижение концентрации зомана в присутствии БСА оценивали биохимическим методом путем определения количества связавшегося с альбумином зомана по остаточному ингибированию АХЭ. Калибровку по зоману делали в диапазоне концентраций $1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-7}$ М (рис. 2).

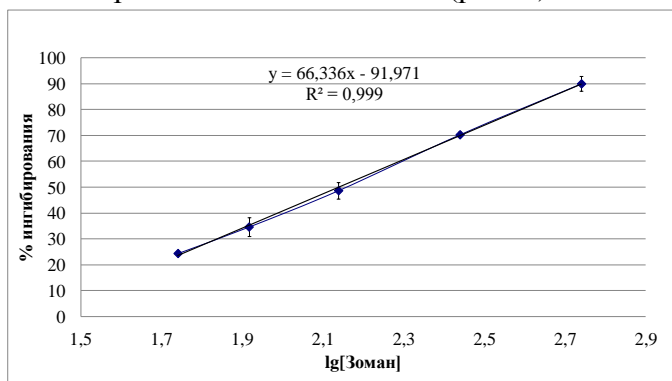


Рисунок 2. Калибровка по зоману в диапазоне концентраций $1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-7}$ М.

Скорость гидролиза зомана альбумином рассчитывали по разнице концентраций «общего» и «свободного» зомана за 60 мин. Данные вносили в программу GraphPad Prism для обработки в моделях «грубой» линеаризации по Скетчарду и Лайнуиверу-Берку. Согласно расчету для одного сайта связывания, $V_{max}=231,9 \pm 6,5$ мкМ и $K_d=46,1 \pm 6,2$ мкМ; для двух сайтов связывания $V_{max1}=37,8 \pm 5,5$ мкМ, $K_{d1}=3,2 \pm 1,2$ мкМ, $V_{max2}=211,3 \pm 22,1$ мкМ, $K_{d2}=90,1 \pm 12,4$ мкМ. По результатам применения формализма Михаэлиса-Ментен ко всему диапазону исследуемых концентраций зомана, $K_m=4,1$ мкМ, $V_{max}=0,013$ мкМ·мин⁻¹. При разделении на два диапазона концентраций (точка раздела 0,56 мкМ) показатели для условно «низких» концентраций: $K_{m1}=0,166$ мкМ, $V_{max1}=0,0014$ мкМ·мин⁻¹; для условно «высоких»: $K_{m2}=46,3$ мкМ, $V_{max2}=0,09$ мкМ·мин⁻¹. Уточнение этих показателей возможно,

во-первых, при работе с насыщающими концентрациями зомана (а это означает существенное превышение – на несколько порядков - токсикологически релевантных концентраций), во-вторых, путем измерения скоростей образования двух продуктов реакции - фторид-иона и пинаколилметилфосфоновой кислоты – в рамках одного эксперимента с использованием селективных ингибиторов и прецизионных химико-аналитических методов. Трудности интерпретации и соотнесения полученных данных с тем или иным сайтом обусловлены необходимостью работы с ненасыщающими концентрациями зомана. Мы полагаем, что показатели, свидетельствующие о более высоком сродстве с низкой скоростью реакции и конечной емкостью (K_{m1} , K_{d1} , V_{max1} , V_{max1}), характеризуют сайт Садлоу II, тогда как показатели, свидетельствующие о более низком сродстве с высокой скоростью реакции и конечной емкостью (K_{m2} , K_{d2} , V_{max2} , V_{max2}), характеризуют сайт Садлоу I. Подтверждение этих предположений может быть получено в экспериментах *in silico*.

Поиск сайтов, ответственных за эстеразную активность альбумина, методами молекулярного моделирования. Анализ *in silico* взаимодействия зомана с ЧСА.

До сих пор остается невыясненным вопрос, какие именно аминокислоты альбумина отвечают за эстеразную и псевдоэстеразную активность. Установлено, что Tyr411 образует устойчивые ковалентные аддукты преимущественно с агентами G-типа (зарин, зоман), а Tyr150 - с агентами V-типа (*John et al.*, 2010). На основании этих данных Tyr411 и Tyr150 были выбраны в качестве основных а.о. для исследования взаимодействия ЧСА с зоманом методами молекулярного моделирования. Известно, что для продуктивного связывания молекул субстратов и необратимых ингибиторов в активном центре холинэстераз необходима активация аминокислот каталитической триады, в ходе которой происходит переход протона с гидроксила серина на имидазольное кольцо каталитического гистидина (*Белинская и др.*, 2010). Мы предположили, что аналогичный перенос протона необходим и при связывании зомана с альбумином. Поэтому для процедуры молекулярного докинга мы использовали два состояния процесса протонирования остатков тирозина по положениям 150 и 411: протонированное (1, неактивированное) и депротонированное (2, активированное). При анализе ближайшего окружения Tyr411 и Tyr150 были выбраны Lys414 и His242, соответственно, в качестве акцепторов протонов. Проведен молекулярный докинг изомеров зомана в эти сайты при различном состоянии протонирования тирозинов, стабильность полученных комплексов проверена методом молекулярной динамики (табл.5, рис.5).

Докинг зомана в сайт Tyr411 ЧСА. Анализ комплексов зомана в сайте Tyr411 при протонировании остатка тирозина показал, что значение $dist(O-P)$ составляет 0.68 нм для C(+) изомеров, 0.72 и 0.73 нм для P(-)C(-) и P(+)C(-) изомеров, соответственно (рис.3а). Атака гидроксила серина холинэстераз на карбонильный атом углерода лиганда возможна при расстоянии между ними меньшем, чем 4 Å (*Kua et al.*, 2002; *Zhan et al.*, 2002). Согласно этому критерию, полученные значения $dist(O-P)$ слишком велики для нуклеофильной атаки Tyr411 атома фосфора зомана, образование ковалентной связи между зоманом и Tyr411 невозможно. Значения K_d варьируют от 578 до 859 мкМ. В комплексах зомана в сайте Tyr411 при депротонировании остатка тирозина все стереоизомеры связываются с гидроксилом тирозина в одном и том же положении

относительно тирозина, значение dist(P-O) составляет 0.36 нм для P(+) $\text{C}(+)$ изомера и 0.37 нм для других трех изомеров (рис. 3б). В таком положении возможна атака гидроксилом тирозина атома фосфора зомана. Все изомеры связываются с одинаковой эффективностью, поскольку значения K_d варьируют от 404 до 484 мкМ. Исключение составляет P(+) $\text{C}(+)$ изомер, для которого $K_d = 685$ мкМ.

Таблица 5. Оценка связывания зомана с двумя остатками тирозина ЧСА.

Сайт связывания и его состояние	Характеристики связывания	Стереизомеры зомана			
		P(-)C(-)	P(+) $\text{C}(-)$	P(-)C(+)	P(+) $\text{C}(+)$
411 неактивированный	K_d (μM)	578,1	593,9	718,9	859,1
	Геометрия (на одной прямой?)	нет	нет	нет	нет
	Расстояние O-P (нм)	0,72	0,73	0,68	0,68
	Оценка продуктивности	нет	нет	нет	нет
411 активированный	K_d (μM)	439,5	483,7	403,7	684,6
	Геометрия (на одной прямой?)	нет	да	нет	да
	Расстояние O-P (нм)	0,37	0,37	0,37	0,36
	Оценка продуктивности	нет	да	нет	да
150 неактивированный	K_d (μM)	264,1	451,0	183,5	431,9
	Геометрия (на одной прямой?)	да	да	да	да
	Расстояние O-P (нм)	0,36	0,33	0,34	0,34
	оценка продуктивности	да	да	да	да
150 активированный	K_d (μM)	277,6	439,4	195,2	431,7
	Геометрия (на одной прямой?)	да	да	да	да
	Расстояние O-P (нм)	0,34	0,33	0,34	0,34
	оценка продуктивности	да	да	да	да

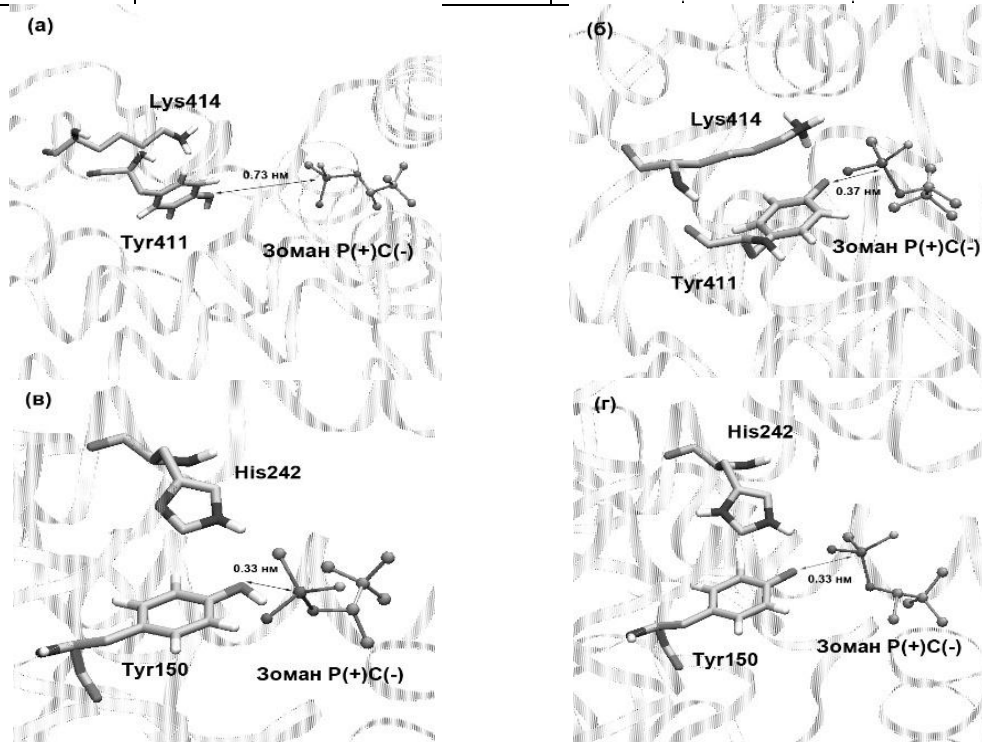


Рисунок 3. P(+) $\text{C}(-)$ стереоизомер зомана, сорбированный в сайтах ЧСА Tyr411 (а,б) и Tyr150 (в,г) в состояниях протонирования 1 (а,в) и 2 (б,г).

Докинг зомана в сайт Tyr150 альбумина. Анализ комплексов зомана в сайте Tyr150 при протонировании выявил, что все стереоизомеры связываются с гидроксильной группой тирозина в одном положении, а расстояние между гидроксильным атомом кислорода тирозина и атомом фосфора зомана варьирует от 0.33 до 0.36 нм (рис. 3в). K_d для P(+) стереоизомеров выше, чем для P(-) изомеров. Это важно, т.к. P(-) изомеры зомана более токсичны (Benschop et al., 1984). C(-) и C(+) энантиомеры связываются с одинаковой эффективностью. В комплексах зомана в сайте Tyr150 в состоянии протонирования 2 все стереоизомеры также сорбируются в одинаковой позиции, значение dist(P-O) варьирует от 0.33 до 0.34 нм (рис. 3г). Во всех полученных комплексах атомы кислорода тирозина, фтора и фосфора зомана лежат на одной прямой, что удовлетворяет требованиям продуктивности. По данным докинга, зоман с одинаковой эффективностью связывается с активированным и неактивированным сайтом Tyr150, влияния состояния протонирования сайта Tyr150 на значения dist(P-O) и K_d не обнаружено. Все комплексы зомана с сайтом Tyr150 могут считаться продуктивными. Выявлена незначительная стереоселективность сайта Tyr411 по отношению к P(-) стереоизомерам зомана, тогда как для сайта Tyr150 эта стереоселективность ярко выражена. Однако метод докинга не учитывает такие факторы как стерическое влияние молекул воды и подвижность белка, которые могут влиять на процесс взаимодействия белка с лигандом. Для выявления аллостерической модуляции в молекуле альбумина исследовали влияние сорбции зомана в сайте Tyr150 на сорбцию зомана в сайте Tyr411.

Молекулярная динамика комплексов зомана с альбумином. Время, необходимое для образования ковалентной связи, не превышает 10 пс (Chen, 2011; Sant'Anna et al., 2006). Для проверки стабильности полученных методом докинга комплексов проведен расчет траекторий движения атомов методом молекулярной динамики. Продолжительность симуляции (длина траекторий) составила 1000 пс. По полученным траекториям построена зависимость от времени расстояния dist(O-P) . Анализ траекторий показал, что комплексы стереоизомеров зомана с Tyr411 в обоих состояниях протонирования нестабильны. В процессе симуляции расстояние между атомом кислорода тирозина и атомом фосфора зомана (значение dist(P-O)) не опускалось ниже 0.38 нм. Следовательно, структурных изменений данных комплексов недостаточно для образования продуктивного фермент-лигандного комплекса. Комплексы зомана с неактивированным сайтом Tyr150 также нестабильны. За весь период симуляции ни у одного из изомеров расстояние (O-P) не опускается ниже 0,38 нм на достаточное для реакции время. Таким образом, для реакции гидролиза в сайте Tyr150 необходима его активация, т.е. перенос протона с тирозина на гистидин. Молекулярная динамика комплексов изомеров зомана с активированным сайтом Tyr150 показаны на рис.4а и более подробно первые 20 пс симуляции на рис.4б. Результаты молекулярной динамики комплексов изомеров зомана в сайте Tyr150 в состоянии протонирования 2 отличаются в зависимости от вида изомера лиганда. Комплексы альбумина с P(+) изомерами зомана нестабильны, значение dist(P-O) не опускается ниже 0.38 нм на протяжении всего периода симуляции, тогда как комплексы белка с P(-) стереоизомерами зомана стабильны на протяжении 20 пс, что является достаточным временем для стехиометрического (фосфонилирование) или каталитического взаимодействия с тирозином.

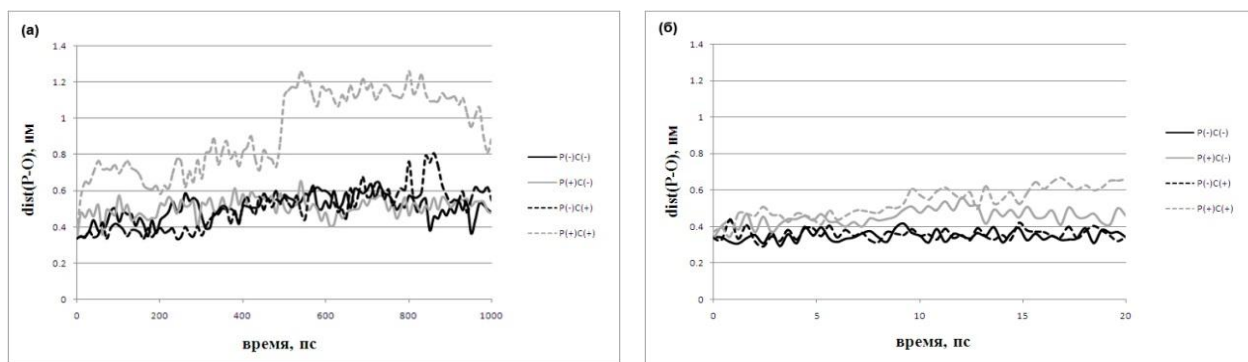


Рисунок 4. (а) Зависимость расстояния между гидроксильным кислородом активированного Tyg150 и атомом фосфора четырех изомеров зомана ($dist_{O-P}$) от времени. (б) Зависимость расстояния между гидроксильным кислородом активированного Tyg150 и атомом фосфора четырех изомеров зомана от времени (первые 20 пс симуляции).

Связывание зомана в других сайтах альбумина. Ранее было показано, что 82 а.о. молекулы альбумина могут быть ацетилированы при взаимодействии с НФА (*Lockridge et al.*, 2008). Мы проанализировали окружение этих и других аминокислот на наличие возможных акцепторов протона, которые могли бы работать аналогично гистидину в каталитической триаде АХЭ, принимающему протон с каталитического серина. После предварительного тестирования для дальнейшей проверки были отобраны 40 сайтов, проведен докинг P(-)C(-) изомера зомана в эти сайты. Для полученных комплексов были рассчитаны K_d и расстояния между атомами фосфора зомана и карбоксильным атомом кислорода (азота в случае лизина) изучаемой аминокислоты ($dist(P-O(N))$). Анализ данных показал, что K_d большинства комплексов очень велики (от 1010 до 23100 мкМ). Лишь несколько значений K_d комплексов близки к полученным при докинге изомеров зомана в сайты Tyg150 и Tyg411 (табл. 6). Результатом молекулярного докинга зомана по сайту Ser192 является комплекс с $K_d=581$ мкМ. Однако расстояние между атомами фосфора лиганда и кислородом гидроксильной группы серина составляет 1.1 нм. В то же время, графический анализ выявил, что молекула зомана сорбируется около сайта Ser193, а расстояние между фосфором зомана и гидроксильным кислородом Ser193 составляет 0.38 нм. Результатом молекулярного докинга зомана по сайту Ser193 является комплекс с $K_d=518$ мкМ. Полученная конформация совпадает с результатом докинга по Ser192. Отсутствие ковалентных аддуктов в благоприятных для этого условиях ($dist(P-O)=0.38$ нм, $K_d=518$ мкМ) свидетельствует о том, что Ser193 может обеспечивать истинно эстеразную активность альбумина и гидролиз молекулы зомана. Важно, что возле Ser193 находится остаток гистидина, а расстояние между гидроксильным кислородом серина и атомом Nδ гистидина, способным акцептировать протон, составляет всего 0.22 нм.

Таким образом, согласно данным молекулярного докинга, помимо сайтов Tyg150 и Tyg411, только сайты Ser193 и Lys402 могут продуктивно взаимодействовать с зоманом. Чтобы более подробно исследовать свойства этих сайтов, был проведен докинг трех других стереоизомеров зомана в эти центры связывания, результаты представлены в табл.7. Как в случае Ser193, так и в случае Lys402, только P(-) изомеры зомана связываются с этими сайтами на достаточно близком расстоянии для нуклеофильной атаки кислородом (азотом) фосфора зомана.

Таблица 6. Результаты молекулярного докинга P(-)C(-) изомера зомана в возможные сайты фосфонилирования или эстеразной активности ЧСА.

Сайт связывания	K_d , мкМ	dist (P-O(N)), нм	Ближайшая к лиганду аминокислота	Расстояние до ближайшей аминокислоты, нм	Ацетилирование NPA [Lockridge et al., 2008]
Tyr411	601	0.72	-	-	+
Tyr150	280	0.36	-	-	-
Ser192	581	1.06	Ser193	0.38	+
Ser193	518	0.38	-	-	-
Thr243	290	1.28	Tyr150	0.35	-
Ser287	295	0.77	Tyr150	0.36	+
Lys402	737	0.37	-	-	+
Ser454	572	1.14	Tyr411	0.71	+
Thr540	759	0.87	Lys402	0.37	+

Табл. 7. Результат молекулярного докинга изомеров зомана в сайты Ser193 и Lys402 ЧСА.

Сайт связывания	Параметры связывания	Стереоизомеры зомана			
		P(-)C(-)	P(+)C(-)	P(-)C(+)	P(+)C(+)
Ser193	K_d , мкМ	518	598	787	633
	dist(P-O(N)), нм	0.38	0.41	0.37	0.40
Lys402	K_d , мкМ	737	902	763	1031
	dist(P-O(N)), нм	0.37	0.43	0.37	0.55

Для проверки правильности расчетов и корректности используемого метода был осуществлен положительный контроль: молекулярный докинг НФА в сайты Ser193 и Lys402. Анализ полученных комплексов показал, что для Lys402 $K_d=27$ мкМ. Расстояние между карбонильным углеродом лиганда и N ζ лизина равняется 0.37 нм, что достаточно для образования ковалентной связи. В случае Ser193, K_d полученного комплекса равна 40мкМ. Но графический анализ показал, что лиганд связывается на расстоянии 1.4 нм от остатка серина, так что атака серина на карбонильный углерод НФА невозможна. Анализ окружения лиганда в данном комплексе показал, что НФА сорбирован в районе Ser454, который может быть ацетилирован (Lockridge et al., 2008).

Сравнительный анализ *in silico* взаимодействия параоксона с ЧСА и БСА

Докинг молекулы параоксона в сайты Tyr150(149) и Tyr411(410) ЧСА и БСА. Для докинга параоксона в сайт Tyr150 ЧСА использовали трехмерную модель ЧСА с молекулой варфарина в сайте Tyr150 из PDB (код структуры 4bxd), для докинга параоксона в сайт Tyr411 ЧСА – модель ЧСА с молекулой ибупрофена в сайте Tyr411 (код 4bxg), а для комплексов параоксона с сайтами Tyr149 и Tyr410 БСА – трехмерная модель БСА со связанной в сайте Tyr149 молекулой диэтиленгликоля и связанной в сайте Tyr410 молекулой напроксена (код 4or0). Характеристики этих комплексов приведены в табл.8. На рис.5а представлены результаты молекулярного докинга молекулы параоксона в сайты связывания Tyr150 ЧСА и Tyr149 БСА. Несмотря на близкие величины K_d , положение параоксона внутри сайта связывания существенно отличается для этих белков ориентацией нитрогруппы и фосфорильного атома кислорода лиганда относительно

остатка тирозина. Анализ ближайшего аминокислотного окружения выявил, что, взаимодействуя с ЧСА, группа NO₂ параоксона образует 2 водородные связи с NH₂-группами остатка Arg222. В молекуле БСА в этом положении находится остаток лизина, который может образовать лишь одну водородную связь. В случае с БСА группа NO₂ параоксона образует 2 водородные связи с NH₂-группами остатка Arg198, а в молекуле ЧСА в этом положении находится остаток лизина. Полученный результат согласуется с работой (Cheng, 2012), в которой показано, что разница в эффективности связывания эргостерола с ЧСА и БСА обусловлена образованием водородной связи между эргостеролом и Arg198. Образование двух водородных связей усиливает прочность комплекса лиганда с белком, обуславливая уменьшение K_d . Поэтому в энергетически наиболее выгодных конформациях комплекса параоксона с альбумином группа NO₂ лиганда повернута к ближайшему остатку Arg. Различное положение аргининов в ЧСА и БСА и объясняет различие положения молекулы параоксона в сайтах связывания Tyr150 ЧСА и Tyr149 БСА при близких значениях K_d . На рисунке 5б представлены результаты молекулярного докинга молекулы параоксона в сайты связывания Tyr411 ЧСА и Tyr410 БСА. Несмотря на существенное различие в оценочных значениях K_d , положение молекулы параоксона относительно аминокислот сайта связывания одинаково для ЧСА и БСА. Сравнение энергетических составляющих показало, что вклад электростатических взаимодействий между белком и лигандом одинаков для обоих ферментов, разница осуществляется за счет энергий водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Такое различие в этих характеристиках можно объяснить разницей в ориентации боковых радикалов аминокислот сайта, преимущественно положения бокового радикала Lys414(413): в случае БСА молекула параоксона находится в более близком контакте с остатком лизина и образуется дополнительная водородная связь между фосфорильным атомом кислорода параоксона и аминогруппой лизина.

Таблица 8. Результат молекулярного докинга параоксона в сайты Tyr150(149) и Tyr411(410) ЧСА и БСА.

Сайт связывания ЧСА(БСА)	Характеристики связывания	ЧСА	БСА
Tyr150(149)	K_d , мкМ	4	9
	dist(P-O), нм	0.36	0.37
Tyr411(410)	K_d , мкМ	87	13
	dist(P-O), нм	0.37	0.35

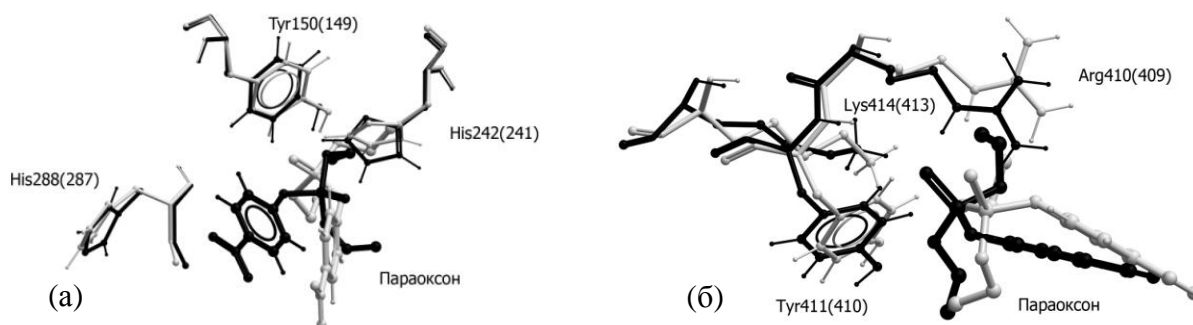


Рисунок 5. Результат молекулярного докинга параоксона в сайты Tyr150(149) (а) и Tyr411(410) (б) ЧСА (светлым) и БСА (темным).

Молекулярная динамика комплексов альбумин-параоксон. Стабильность и конформационные изменения комплексов альбумин-параоксон были изучены методом молекулярной динамики. Длина всех траекторий составила 10 нс. По полученным траекториям рассчитана зависимость величин RMSD а.о. альбумина от времени. Для всех комплексов значение RMSD возрастало в течение первых 3 нс симуляции, затем выходило на плато и варьировало в диапазоне 0.4–0.5 нм, что указывает на стабилизацию полипептидной цепи альбумина. Исключение составил комплекс БСА со связанной в сайте Tyr410 молекулой параоксона: для этого комплекса значение RMSD вышло на плато после 8 нс симуляции. По полученным траекториям рассчитана зависимость расстояния между фосфором параоксона и гидроксильным кислородом тирозинов $\text{dist}(\text{O-P})$ (рис.6).

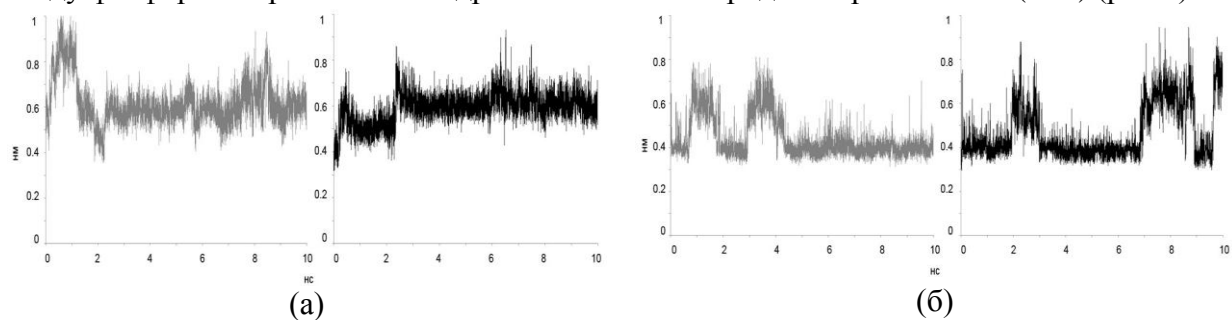


Рисунок 6. Зависимость от времени расстояния между атомом фосфора параоксона и гидроксильным кислородом Tyr150(149) **(а)** и Tyr411(410) **(б)** ЧСА (светлым) и БСА (темным).

Анализ полученных данных показал, что комплекс ЧСА со связанной молекулой параоксона в сайте Tyr150 нестабилен (рис. 6а). Значение $\text{dist}(\text{O-P})$ первые 2 нс симуляции колеблется в промежутке 0.4-1.0 нм, затем оставшиеся 8 нс симуляции остается неизменным и колеблется незначительно на уровне 0.6 нм. Анализ положения молекулы параоксона на этом участке траектории показал, что лиганд «зафиксирован» кулоновским взаимодействием между атомом фосфорильного кислорода параоксона и боковым радикалом аминокислотного остатка Arg257. Следует отметить, что в молекуле БСА в этой позиции также находится остаток аргинина. Комплекс БСА с молекулой параоксона в сайте Tyr149 также нестабилен (рис. 6а). Значение $\text{dist}(\text{O-P})$ за первые 2 нс увеличивается до уровня 0.6 нм и остается неизменным оставшиеся 8 нс. Анализ положения молекулы параоксона на этом участке траектории показал, что лиганд «зафиксирован» водородной связью между фосфорильным кислородом параоксона и атомом Нε2 остатка His241, а NO₂ группа – кулоновским взаимодействием между атомом N лиганда и атомом Oε1 остатка Gln195. В молекуле ЧСА в этих позициях находятся His и Gln соответственно. Как и в ЧСА, анализ аминокислотного окружения параоксона в комплексе с БСА выявил, что в пределах 0.4 нм от атома фосфора лиганда нет ни одной аминокислоты, способной на образование ковалентной связи с молекулой параоксона.

Таким образом, устойчивое положение параоксона в сайтах Tyr150 ЧСА и Tyr149 БСА не совпадает, несмотря на консервативность ближайшего аминокислотного окружения каталитического тирозина. Графический анализ выявил, что в случае БСА аминокислоты в окружении Tyr149 расположены более компактно относительно друг друга, из-за чего стерический размер данного сайта меньше в молекуле БСА по сравнению с ЧСА. Но и для ЧСА, и для БСА образование ковалентной связи между параоксоном и Tyr150(149) невозможно в свободном немодифицированном белке. Триггером,

улучшающим средство сайта Tyr150(149) к параоксону, может служить либо перенос протона с остатка каталитического тирозина на имидазольное кольцо соседнего His242(241) (Белинская и др., 2014), либо модуляция сайта эндогенными лигандами, например, жирными кислотами (Белинская и др., 2017).

Зависимость расстояния между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом кислорода тирозина в комплексах параоксона с Tyr411(410) от времени представлена на рис. 6б. Динамика этой зависимости схожа для ЧСА и БСА: участки «стабильности», на которых расстояние колеблется в пределах 0.37-0.40 нм, чередуются с участками «нестабильности», на которых молекула параоксона отдалается от каталитического тирозина. Графический анализ показал, что на всех «стабильных» участках, как для ЧСА, так и для БСА, положение параоксона одинаково: молекула лиганда стабилизируется образованием водородной связи между группой ОН тирозина и фосфорильным атомом кислорода параоксона. Анализ зависимости расстояния между гидроксильным атомом водорода Tyr411(410) и фосфорильным атомом кислорода лиганда показал, что периоды «стабильности» положения параоксона в сайте связывания совпадают с периодами существования водородной связи между этими атомами. А увеличению расстояния между параоксоном и тирозином, т.е. уходу параоксона из сайта связывания, предшествует разрыв этой водородной связи. Для обоих белков существуют участки «стабильности», на которых расстояние между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом кислорода каталитического тирозина достаточно близкое для образования ковалентной связи между лигандом и белком (Wang et al., 2009).

Таким образом, сайт Tyr411(410) более консервативен: аминокислоты, принимающие участие в связывании параоксона в этом сайте (Tyr411(410), Arg410(409), Lys414(413), Arg257(256)) консервативны. И для ЧСА, и для БСА сайт Tyr411(410) является первичным сайтом фосфорилирования: для продуктивного связывания молекулы ФОС не требуется дополнительных условий (связывания модуляторов в других сайтах) и, согласно данным молекулярной динамики, механизм этого процесса одинаков для обоих белков. Сайт Tyr150(149) менее консервативен. В связывании параоксона принимает участие ближайший к каталитическому тирозину аргинин, образующий водородные связи с молекулой лиганда. В молекуле ЧСА это Arg222, в молекуле БСА – Arg198. Эти аргинины расположены «зеркально» относительно Tyr150(149), поэтому для жестких молекул или для оптически активных соединений можно ожидать различную эффективность связывания. И для ЧСА, и для БСА, продуктивное связывание параоксона в сайте Tyr150(149) возможно лишь после изменений в структуре альбумина (либо перенос протона с каталитического тирозина на имидазольное кольцо соседнего гистидина His242(241), либо конформационные изменения, вызванные связыванием лиганда в других сайтах). В стабильных комплексах альбумина с непродуктивно связанным в сайте Tyr150(149) параоксоном положение боковых радикалов аминокислот сайта различно для ЧСА и БСА. Это может быть связано с разным распределением зарядов в молекулах этих белков: суммарный заряд молекулы ЧСА составляет -14e, а БСА -16e. Ранее было показано (Peters, 1996), что в сыворотке крови человека остаток одиночного Cys34 в 70% молекул альбумина находится в окисленном состоянии. Окисление Cys34 может влиять на распределение зарядов внутри молекулы альбумина, на конформацию Садлоу I и эффективность связывания молекул в этом сайте.

ВЫВОДЫ

- 1) Сайт Садлоу I КСА обладает наибольшей каталитической эффективностью по отношению к *n*-нитрофенилацетату, которая в 2 раза выше эффективности ЧСА и в 5 раз - БСА. Сродство сайта Садлоу II БСА к *n*-нитрофенилацетату в 2 раза выше по сравнению с КСА и ЧСА. Ибупрофен - аллостерический ингибитор карбоксил- и арилэстеразной активности сайта Садлоу I, этот эффект в максимальной степени выражен у КСА и ЧСА, но на порядок меньше у БСА.
- 2) Каталитическая эффективность сайта Садлоу I БСА по отношению к параоксону в 4 раза меньше, чем по отношению к *n*-нитрофенилацетату; для КСА и ЧСА эти отличия составляют 100 и 65 раз, соответственно. Фосфорилирование сайта Садлоу II всех трех видов альбумина при взаимодействии с параоксоном происходит быстрее ацетилирования этих сайтов. Ибупрофен - аллостерический ингибитор фосфотриэстеразной активности сайта Садлоу I; максимальный эффект выявлен у КСА и ЧСА, но в 2 раза меньше у БСА.
- 3) Методом остаточного ингибирования ацетилхолинэстеразы с последующим применением формализма Скетчарда, Михаэлиса-Ментен и методов молекулярного моделирования установлено более высокое сродство зомана к сайту Садлоу II на первой стадии взаимодействия с альбумином и лимитирующий характер второй стадии взаимодействия, что обуславливает преимущественно транспортные функции сайта Садлоу II при токсикологически релевантных концентрациях зомана.
- 4) Согласно предложенной схеме (1), данные молекулярного моделирования характеризуют вторую стадию взаимодействия ФОС с сайтами альбумина. По данным молекулярного докинга, параоксон и токсические P(-) изомеры зомана лучше связываются с Tyr150, чем с Tyr411 ЧСА. Для продуктивного связывания зомана с Tyr411 необходимо депротонирование тирозина, при этом сродство к Tyr411 выше у нетоксичных P(+) изомеров зомана. Помимо Tyr150 и Tyr411, параоксон и токсичные изомеры зомана могут взаимодействовать с Ser193 и Lys402 ЧСА.
- 5) По данным сравнительного биохимического анализа *in vitro* и *in silico*, функциональные характеристики ЧСА и КСА отличаются между собой в меньшей степени по сравнению с характеристиками БСА. Полученные данные подтверждают консерватизм сайта Садлоу II по отношению к сайту Садлоу I всех исследованных видов альбумина, а также свидетельствуют о консерватизме БСА по отношению к КСА и ЧСА.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В реферируемых журналах, рекомендованных ВАК.

1. **Шмурак В. И.** Определение эстеразной активности альбумина в токсикологическом эксперименте. Токсикологический Вестник. - 2011. - №2 - с.46-49.
2. **Шмурак В.И.,** Курдюков И.Д., Надеев А.Д., Войтенко Н.Г., Глашкина Л.М., Гончаров Н.В. Биохимические маркеры интоксикации фосфорорганическими отравляющими веществами. Токсикологический Вестник. - 2012. - №4 - С. 30-34.
3. Прокофьева Д.С., **Шмурак В.И.,** Садовников С.В., Гончаров Н.В. Проблемы определения фосфорорганических отравляющих веществ биохимическими методами на объектах уничтожения химического оружия. Теоретическая и прикладная экология. – 2012. - №4. – С. 99-102.

4. Курдюков И.Д., **Шмурак В.И.**, Надеев А.Д., Войтенко Н.Г., Прокофьева Д.С., Гончаров Н.В. «Эстеразный статус» организма при воздействии токсических веществ и фармпрепаратов. Токсикологический Вестник. - 2012. - №6 - С. 6-13.
5. Белинская Д.А., **Шмурак В.И.**, Прокофьева Д.С., Гончаров Н.В. Исследование связывания зомана с альбумином методами молекулярного моделирования // Токсикологический Вестник. - 2012. - №6 - С. 13-19.
6. Прокофьева Д.С., **Шмурак В.И.**, Садовников С.В., Гончаров Н.В. О необходимости модификации биохимических методов определения фосфорорганических отравляющих веществ на объектах уничтожения химического оружия. Медицина труда и промышленная экология. – 2015. - №3 – С. 42-46.
7. Белинская Д.А., **Шмурак В.И.**, Прокофьева Д.С., Гончаров Н.В. Сывороточный альбумин: поиск новых сайтов взаимодействия с фосфорорганическими соединениями на примере зомана. Биоорганическая химия. 2014. Т. 40. № 5. С. 541.
8. Белинская Д.А., **Шмурак В.И.**, Таборская К.И., Авдонин П.П., Авдонин П.В., Гончаров Н.В. Сравнительный анализ *in silico* связывания параоксона сывороточным альбумином человека и быка. Журнал Эволюционной Биохимии и Физиологии. 2017, Т.53, №3, С.170-177.
9. Гончаров Н.В., Терпиловский М.А., **Шмурак В.И.**, Белинская Д.А., Авдонин П.В. Сравнительный анализ эстеразной и параоксоназной активности различных видов альбумина. Журнал Эволюционной Биохимии и Физиологии. 2017, Т.53, №4, С.241-250.
10. Goncharov N.V., Belinskaia D.A., **Shmurak V.I.**, Terpilowski M.A., Jenkins R.O., Avdonin P.V. Serum Albumin Binding and Esterase Activity: Mechanistic Interactions with Organophosphates. *Molecules*. 2017, 22(7), pii: E1201.

Материалы научных конференций

1. **Шмурак В.И.** Эстеразная активность альбумина и его вклад в детоксикацию зомана. 15-ая Международная пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» г. Пушино, Россия, 18 – 22 апреля 2011 г.
2. **Шмурак В.И.**, Надеев А.Д., Прокофьева Д.С., Бабаков В.Н., Гончаров Н.В. Исследование эстеразной активности альбумина. Сборник статей «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (ред. В.П. Зинченко, С.С. Колесников, А.В. Бережнов). – Пушино, 2011. С.75-80.
3. Prokofieva D., **V. Shmurak**, G. Karakashev, N. Goncharov. Determination of kinetic constants for the interaction between soman and albumin with HPLC-MS in experimental conditions approximating to those *in vivo*. 11th International Meeting on Cholinesterases. 4-9th June 2012, Kazan, Russia. P.201.
4. Belinskaya D., **V. Shmurak**, D. Prokofieva, N. Goncharov. Molecular modeling study binding on soman binding to albumin. 11th Int Meeting on Cholinesterases. 4-9 June 2012, Kazan, Russia. P.204.
5. Подольская Е.П., Гладилович В.Д., Краснов И.А., Дубровский Я.А., **Шмурак В.И.**, Войтенко Н.Г., Фиронов С.В., Бабаков В.Н., Гончаров Н.В. Использование методов фосфопротеомики при анализе ковалентных аддуктов белков крови с фосфорорганическими соединениями. Сб. трудов I международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», 17-19 ноября 2010, Москва, с.55.

Список литературы, цитируемой в автореферате:

- Белинская и др., 2010 // Биоорг. химия, 36(2): 200-205.
Белинская и др., 2014 // Биоорг. химия, 40(5): 541-549.
Белинская и др., 2017 // Биоорг. химия, 43(4): 347-356.
Стефанов и др., 2012 // Биологические мембраны, 29(6): 400-413.
- Ascenzi et al., 2006 // Mini Rev. Med. Chem., 6(4): 483-489.
Ascenzi et al., 2015 // PloS One, 10(3): 1-16.
Ascenzi, Fasano, 2010 // Biophys. Chem., 148: 16-22.
Bender et al., 1967 // J. Chem. Educ., 44(2): 84-88.
Berendsen et al., 1981 // Ed. Pullman B. Dordrecht: Reidel D. Publ. Comp.: 331-342.
Berendsen et al., 1984 // J. Chem. Phys., 81: 3684-3690.
Berendsen et al., 1995 // Comp. Phys. Comm., 91(1): 43-56.
Berman et al., 2000 // Nucleic Acids Res., 28: 235-242.
Bujacz, 2012 // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 68(10): 1278-89.
Bussi et al., 2009 // J. Chem. Phys., 130: 74101-74110.
Chen, 2011 // J. Phys. Chem. B, 115: 1315-1322.
Cheng, 2012 // Mol. Biol. Rep., 39: 9493-9508.
Consortium, 2015 // Nucleic Acids Res., 43: 204-212.
Darden et al., 1993 // J. Chem. Phys., 3: 10089-10092.
De Caro et al., 1986 // Eur. J. Biochem., 158: 601-607.
Fasano et al., 2005 // IUBMB Life, 57(12): 787-796.
Fischer K. et al., 2014 // PLoS Med., 11: e1001606.
Fletcher, Reeve, 1964 // Comput. J., 7: 149-154.
Gani et al., 2008 // J. Biophys., 94: 1412-1427.
Ghuman et al., 2005 // J. Mol. Biol., 353(1): 38-52.
Hess et al., 1997 // J. Comp. Chem., 8: 1463-1473.
Hunter, 2007 // Comp. Science Engineer., 9(3): 90-95.
John et al., 2010 // Anal. Bioanal. Chem., 398: 2677-2691.
Kua et al., 2003 // Protein Sci., 12: 2675-2684.
Li et al., 2005 // Biochem. Pharmacol., 70(11): 1673-1684.
Li et al., 2008 // Chem. Res. Toxicol., 21: 421-431.
Lockridge et al., 2008 // J. Biol. Chem., 283(33): 22582-90.
Main, 1964 // Science, 144(3621): 992-993.
Majorek et al., 2012 // Mol. Immunol., 52(3): 174-182.
McCammon et al., 1977 // Nature, 267(5612): 585-590.
McKinney, 2010 // In: Proceed. 9th Python Science Conf., 445: 51-56.
Morris et al., 1998 // J. Comp. Chem., 19: 1639-1662.
Orekhov A.N. et al., 2014 // Int. J. Mol. Sci.; 15(7): 12807-41.
Pedregosa et al., 2011 // J. Machine Learning Res., 12: 2825-2830.
Pérez, Granger, 2007 // Comp. Science Engineer., 9(3): 21-29.
Peters, 1996 // London: Academic Press Ltd, 432.
Reichenwallner, Hinderberger, 2013 // Biochim. Biophys. Acta, 1830(12): 5382-5393.
Sand et al., 2015 // Front Immunol., 5: 682.
Sant'Anna et al., 2006 // Bioorg. Chem., 34: 77-89.
Sievers et al., 2011 // Mol. Syst. Biol., 7: 539.
Strausberg et al., 2002 // Proc. Natl. Acad. Sci USA., (99): 16899-16903.
Strauss et al., 1977 // J. Biol. Chem., 252(19): 6846-6855.
Van Der Walt et al., 2011 // Comp. Science Engineer., 13(2): 22-30.
Wang et al., 2009 // J. Chem. Inf. Model., 28(2): 162-169.
Zhang et al., 2002 // J. Am. Chem. Soc., 124(35): 10572-10577.

Список сокращений:

АХЭ – ацетилхолинэстераза; АТХ – ацетилтиохолин; БСА – бычий сывороточный альбумин;
ДТНБ – 5,5-дитио-бис-2-нитробензойная кислота; НФА – *n*-нитрофенилацетат; ФБ – фосфатный буфер
ФОВ – фосфорорганические отравляющие вещества; ФОС – фосфорорганические соединения;
ЧСА – сывороточный альбумин человека