

ВЗАИМОСВЯЗЬ КОНСТАНТ ИНГИБИРОВАНИЯ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-2 ОЛИГОПЕПТИДОМ APP-IP И ЕГО МУТАНТНЫМИ ФОРМАМИ И ЭЛЕКТРОННЫХ ДЕСКРИПТОРОВ СВЯЗЫВАНИЯ

© 2021 г. А. М. Кулакова¹, М. Г. Хренова^{1,2*}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Институт биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: khrenova.maria@gmail.com

Поступила в редакцию 04.06.2020;

после доработки 27.06.2020;

принята в печать 20.07.2020

Для комплексов металлопротеиназы-2 с ингибитором APP-IP и его мутантными формами рассчитаны дескрипторы электронной плотности и показано, что функция локализации электронов ELF координационной связи катиона цинка и атома лиганда показывает различия в экспериментально наблюдаемых константах ингибирования.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы, ингибирование, дескрипторы электронной плотности, молекулярное моделирование.

DOI: 10.31857/S0207401X2106008X

1. ВВЕДЕНИЕ

Матриксные металлопротеиназы (ММП) – семейство внеклеточных цинкзависимых эндопептидаз, регулирующих постоянство состава внеклеточного матрикса. При развитии онкологических заболеваний в ряде случаев происходит неконтролируемый рост концентрации активной формы этих ферментов, что приводит к ускорению распространения метастазов. Поэтому актуальной задачей является разработка соединений, селективно ингибирующих эти белки [1, 2].

В недавней работе было показано, что олигопептид-предшественник β -амилоида APP-IP является селективным ингибитором матриксной металлопротеиназы второго типа – ММП-2 [3]. На основании данных рентгеноструктурного анализа показано, что при образовании нековалентного комплекса фермента с ингибитором аминокислотный остаток Asp6 образует координационную связь с катионом цинка активного центра. При этом остальные аминокислотные остатки олигопептида APP-IP располагаются в связывающих карманах на поверхности белка (рис. 1). В более поздних работах были экспериментально изучены мутантные формы APP-IP с точечными аминокислотными заменами Asp6Cys (APP-IP-Asp6Cys) и Asp6Ser (APP-IP-Asp6Ser). Цистеиновый мутант оказался более слабым ингибитором, чем исход-

ный APP-IP. Их константы ингибирования составляют $7 \cdot 10^{-6}$ и $4 \cdot 10^{-8}$ М соответственно. При этом сериновый мутант APP-IP-Asp6Ser не проявлял ингибирующую способность вплоть до концентрации 10^{-4} М [4].

В данной работе предлагается интерпретация наблюдаемой закономерности на основании изучения электронно-плотностных характеристик комплексов фермент–ингибитор, а также модельных систем, содержащих ацетат, метанол и метантиол, сольватированных молекулами воды.

2. МОДЕЛИ И МЕТОДЫ

В работе исследуется электронная плотность для трех модельных систем, представляющих собой комплексы ММП-2 с APP-IP или его мутантными формами; структуры комплексов с APP-IP и APP-IP-Asp6Cys были ранее исследованы в работе [5]. Эти структуры получены по результатам расчетов комбинированным методом квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ) равновесных геометрических параметров систем, состоящих из белковой макромолекулы, олигопептидного ингибитора, катиона цинка активного центра фермента, структурообразующих катионов кальция и цинка, а также молекул воды, сольватирующих белок. Описание квантовомеханиче-

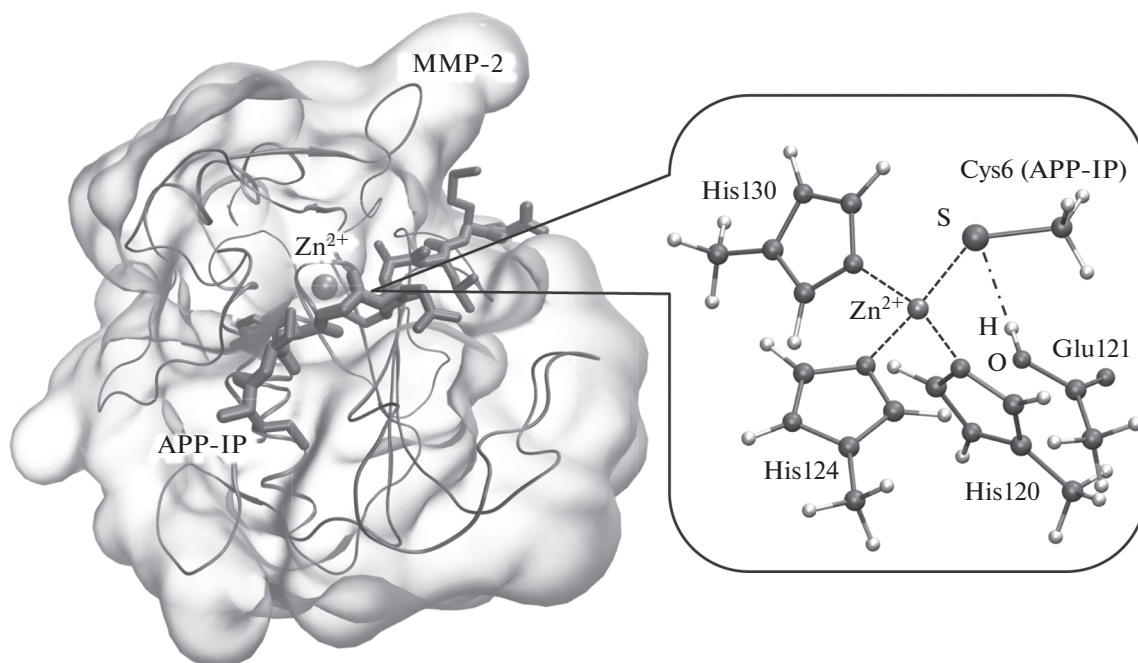


Рис. 1. КМ/ММ-модель комплекса MMP-2 с ингибитором APP-IP-Asp6Cys. Прозрачной изоповерхностью и лентами показан белок MMP-2, стержнями – APP-IP-Asp6Cys. Шаростержневое представление соответствует активному центру фермента, координационные связи цинка показаны штриховыми линиями, водородная связь обозначена штрих-пунктирной линией.

ской подсистемы проводилось зарекомендовавшим себя [6] методом функционала электронной плотности в варианте PBE0/6-31G** [7], атомы белковой макромолекулы и катионы металла классической подсистемы описывались силовым полем AMBER [8], а молекулы воды – набором параметров TIP3P [9].

Для изучения систем в водном растворителе использовали кластерную модель с микросольватацией, т.е. добавляли несколько молекул воды для насыщения изучаемой молекулы водородными связями: в случае ацетата – 5 молекул воды, в случае метанола и метантиола – по три молекулы воды. Расчеты также проводились методом PBE0/6-31G**. Все квантовохимические и КМ/ММ-расчеты проводились в программном пакете NWChem [10]. Для анализа электронной плотности использовался программный пакет Multiwfn [11]. В рамках квантово-топологической теории атомов в молекулах [12] находились критические точки связи (КТС), являющиеся седловыми точками электронной плотности и характеризующие взаимодействующие пары атомов. В данной работе нас интересовали координационные связи цинка и боковой цепи шестого остатка ингибитора, а также водородная связь шестого остатка ингибитора с аспаратом активного центра (цистеина, аспартата или серина; см. рис. 1). Для систем с микросольватацией анализировались водородные связи изучаемых молекул с молекулами воды.

Важность изучения этих связей показана в работах [13–15]. В качестве дескрипторов электронной плотности в КТС использовали саму электронную плотность ρ_b , лапласиан электронной плотности $\nabla^2\rho_b$, эллиптичность ϵ , плотность электронной энергии H_b , функцию локализации электронов ELF, локатор локализованных орбиталей LOL и индекс η , определяющийся как абсолютная величина отношения наименьшего и наибольшего собственных значений гессиана электронной плотности и характеризующий связь. Эти дескрипторы были успешно применены для объяснения различий в реакционной способности цефалоспориновых соединений в бактериальных цинк-зависимых ферментах – металло- β -лактамазах [16–18]. Для визуализации трехмерных моделей использована программа VMD [19].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ взаимодействий в комплексах MMP-2 – олигопептид

В табл. 1 представлены электронно-плотностные характеристики изучаемых систем. Все рассматриваемые координационные и водородные связи удовлетворяют условиям для лапласиана электронной плотности $\nabla^2\rho_b > 0$ и плотности электронной энергии $H_b < 0$ в КТС, что соответствует промежуточному типу связей между кова-

Таблица 1. Свойства координационных и водородных связей в модельных системах: равновесные расстояния R (Å) и дескрипторы в критических точках связи (электронная плотность ρ_b (а.е.), лапласиан электронной плотности $\nabla^2\rho_b$ (а.е.), эллиптичность ε , плотность электронной энергии H_b (а.е.), функция локализации электронов ELF, локатор локализованных орбиталей LOL и индекс η

Связь	R	ρ_b	$\nabla^2\rho_b$	ε	H_b	ELF	LOL	η
Комплекс APP-IP с MMP-2								
O1...Zn	2.23	0.047	0.196	0.042	-0.006	0.092	0.241	0.188
O2...Zn	2.09	0.068	0.253	0.024	-0.020	0.131	0.280	0.217
O...H	1.66	0.053	0.151	0.022	-0.002	0.220	0.347	0.278
Сумма		0.167						
Комплекс APP-IP-Asp6Cys с MMP-2								
S...Zn	2.28	0.073	0.139	0.067	-0.027	0.258	0.371	0.274
H...S	2.39	0.020	0.039	0.058	-0.001	0.143	0.291	0.262
Сумма		0.093						
Комплекс APP-IP-Asp6Ser с MMP-2								
O...Zn	1.91	0.098	0.375	0.022	-0.044	0.157	0.302	0.217
H...O	1.41	0.100	0.105	0.039	-0.045	0.431	0.465	0.418
Сумма		0.197						
Ацетат с микросольватацией								
O...HO(вода)	2.04	0.023	0.064	0.005	-0.001	0.089	0.238	0.233
»	1.75	0.041	0.117	0.013	-0.001	0.177	0.317	0.259
»	2.00	0.025	0.068	0.007	-0.001	0.100	0.250	0.239
»	2.08	0.021	0.058	0.067	-0.001	0.079	0.226	0.235
»	1.70	0.046	0.131	0.044	-0.001	0.202	0.335	0.271
Сумма		0.156						
Метантиол с микросольватацией								
SH...O(вода)	2.01	0.026	0.060	0.043	-0.002	0.129	0.278	0.262
S...HO(вода)	2.85	0.007	0.027	0.333	0.001	0.020	0.127	0.163
»	2.34	0.022	0.048	0.062	-0.001	0.127	0.276	0.256
Сумма		0.055						
Метанол с микросольватацией								
OH...O(вода)	1.76	0.038	0.114	0.041	0.0001	0.155	0.300	0.254
O...HO(вода)	1.94	0.035	0.107	0.068	-0.0001	0.140	0.287	0.249
»	1.80	0.028	0.077	0.062	-0.001	0.111	0.261	0.249
Сумма		0.101						

лентными и нековалентными взаимодействиями [20]. Среди всех комплексов наибольшим значением индекса η характеризуется координационная связь S...Zn, что говорит о ее наибольшем ковалентном характере среди трех рассматриваемых типов координационных связей между цинком и функциональной группой [21]. Это наблюдение полностью соответствует многочисленным экспериментальным данным о структурообразующей функции координационной связи атома серы остатка цистеина и катиона цинка [22], например в случае образования мотива цинкового пальца [5]. Если сравнить между собой системы, в которых атомы кислорода образуют координационные

связи с катионом цинка, можно заметить, что индекс η одинаковый для связи O2...Zn в системе с карбоксилатом и для связи цинка с алкоголятом (табл. 1). При этом координационная связь в системе с остатком серина короче, чем в системе с аспаратом. Это связано с тем, что в комплексе с APP-IP координационное число цинка возрастает до 5, что не является типичным для катиона Zn^{2+} .

Еще одной характеристикой электронной плотности является функция локализации электронов ELF. Анализ профилей ELF применяется для определения силы водородной связи [23]. Мерой количественной оценки служит индекс

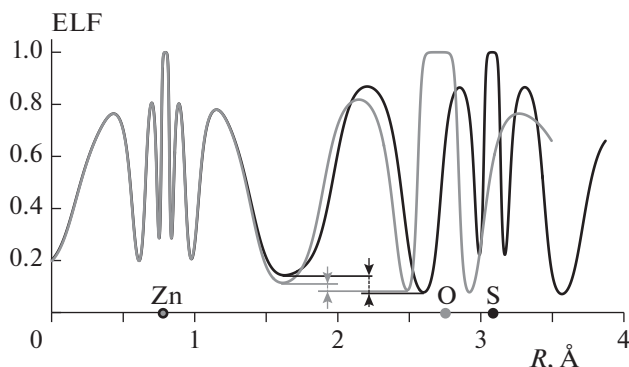


Рис. 2. Профиль ELF вдоль линии связей Zn...S и Zn...O в комплексе MMP-2 с ингибиторами APP-IP-Asp6Cys и APP-IP-Asp6Ser соответственно.

CVB (core-valence bifurcation), определяемый как разность значений ELF в минимуме, соответствующем границе между остовной и валентной областями атома, донирующего электронную пару в нековалентное взаимодействие, и в минимуме между валентными областями двух атомов. На рис. 2 представлены профили ELF для двух координационных связей в системах с остатком цистеина и серина. Из этих профилей можно видеть, что индекс CVB для связи Zn...S значительно превышает таковой для связи Zn...O. Это обстоятельство дополнительно подтверждает вывод о том, что координационная связь с атомом серы является более прочной.

Взаимодействия функциональных групп с молекулами воды

Для описания взаимодействий функциональных групп в растворе использовалась модель микросольватации (подробнее см. в разд. 2). Проводилось изучение водородных связей молекул ацетата, метанола и метантиола с молекулами воды. Метанол и метантиол находились в нейтральной форме, что соответствовало условиям ферментативных экспериментов. Для всех исследуемых систем водородные связи характеризуются небольшим отрицательным или небольшим положительным значениями H_b , что говорит о сильных водородных связях и связях средней силы.

Факторы, определяющие константы ингибирования

Процессы образования комплексов белок–ингибитор происходят в водных растворах, поэтому при определении параметров связывания необходимо сопоставить взаимодействия с участием лиганда в растворе и в белке. Значения плотности электронной энергии H_b значительно выше (менее отрицательные) в расчетах в рамках

модели микросольватации, чем в активном центре фермента, что свидетельствует о более слабых взаимодействиях в первом случае. Далее сравнивались значения электронной плотности в критической точке связи в белковых и кластерных моделях. Такое сравнение показывает, что суммарная электронная плотность, приходящаяся на все взаимодействия, в белке выше. При этом значения для систем с ингибиторами APP-IP и APP-IP-Asp6Cys сравнимы. В то же время для системы с APP-IP-Asp6Ser наблюдается двукратное изменение электронной плотности при переходе от сольватационной оболочки к активному центру фермента. На данном этапе исследования сложно дать однозначную интерпретацию взаимосвязи ингибирующей способности и разности электронной плотности в КТС. Возможно, чрезмерное накопление электронной плотности в КТС приводит к увеличению стерической электронной энергии, что дестабилизирует такие взаимодействия. Интерпретация данного факта, а также анализ нелокальных дескрипторов электронной плотности будут проводиться в последующих работах.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методами квантовой химии и КМ/ММ исследованы комплексы олигопептидных ингибиторов на основе APP-IP с MMP-2, а также модельные соединения со спиртовой, карбоксильной и тиольной группами в водном окружении. Взаимодействия этих функциональных групп количественно охарактеризованы с помощью дескриптора электронной плотности, связанного с функцией локализации электронов ELF и рассчитанного в критических точках связей. Это позволило интерпретировать отсутствие ингибирующей способности мутантной формы APP-IP-Asp6Ser.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 18-03-00605) с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ им. М.В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vandenbroucke R.E., Libert C.* // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2014. V. 13. P. 904; <https://doi.org/10.1038/nrd4390>
2. *Ndinguri M.W., Bhowmick M., Tokmina-Roszyk D., Robichaud T.K., Fields G.B.* // *Molecules.* 2012. V. 17. Issue 12. P. 14230; <https://doi.org/10.3390/molecules171214230>
3. *Hashimoto H., Takeuchi T., Komatsu K. et al.* // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 33236; <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.264176>
4. *Khrenova M.G., Solovyev I.D., Lapshin G.D., Savitsky A.P.* // *Mendeleev Commun.* 2017. V. 27. Issue 2. P. 157; <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2017.03.017>

5. *Khrenova M.G., Savitsky A.P., Topol I.A., Nemukhin A.V.* // J. Phys. Chem. B. 2014. V. 118. Issue 47. P. 13505; <https://doi.org/10.1021/jp5088702>
6. *Метелешко Ю.И., Немухин А.В., Хренова М.Г.* // Хим. физика. 2019. Т. 38. № 6. С. 3.
7. *Adamo C., Barone V.* // J. Chem. Phys. 1999. V. 110. P. 6158; <https://doi.org/10.1063/1.478522>
8. *Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I. et al.* // J. Amer. Chem. Soc. 1995. V. 117. Issue 19. P. 5179; <https://doi.org/10.1021/ja00124a002>
9. *Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L.* // J. Chem. Phys. 1983. V. 79. Issue 2. P. 926; <https://doi.org/10.1063/1.445869>
10. *Valiev M., Bylaska E. J., Govind N. et al.* // Comput. Phys. Commun. 2010. V. 181. Issue 9. P. 1477; <https://doi.org/10.1016/j.cpc.2010.04.018>
11. *Lu T., Chen F.* // J. Comput. Chem. 2012. V. 33. Issue 5. P. 580; <https://doi.org/10.1002/jcc.22885>
12. *Bader R.F.W.* Atoms in Molecules – A Quantum Theory. Oxford University Press, 1990.
13. *Майоров В.Д., Волощенко Г.И., Кислина И.С., Тараканова Е.Г.* // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 1. С. 7.
14. *Тарасов Д.Н., Тигер Р.П.* // Хим. физика. 2019. Т. 38. № 5. С. 45.
15. *Абдуллаев А.А., Рабаданов Г.А.* // Хим. физика. 2018. Т. 37. № 3. С. 3.
16. *Хренова М.Г., Томилко А.В., Цирельсон В.Г.* // Вестн. МГУ. Сер. 2, Химия. 2019. Т. 60. № 3. С. 141.
17. *Khrenova M.G., Tsirelson V.G.* // Mendeleev Commun. 2019. V. 29. Issue 5. P. 492; <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2019.09.004>
18. *Khrenova M.G., Krivitskaya A.V., Tsirelson V.G.* // New J. Chem. 2019. V. 43. P. 7329; <https://doi.org/10.1039/c9nj00254e>
19. *Humphrey W., Dalke A., Schulten K.* // J. Mol. Graph. 1996. V. 14. Issue 1. P. 33; [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
20. *Bader R.F.W., Essen H.* // J. Chem. Phys. 1984. V. 80. P. 1943; <https://doi.org/10.1063/1.446956>
21. *Niepötter B., Herbst-Irmer R., Kratzert D. et al.* // Angew. Chem. Intern. Ed. 2014. V. 53. Issue 10. P. 2766; <https://doi.org/10.1002/anie.201308609>
22. *Laitaoja M., Valjakka J., Jänis J.* // Inorg. Chem. 2013. V. 52. Issue 19. P. 10983; <https://doi.org/10.1021/ic401072d>
23. *Fuster F., Silvi B.* // Theor. Chem. Acc. 2000. V. 104. Issue 1. P. 13; <https://doi.org/10.1007/s002149900100>