

УДК 577.325.4, 577.332, 577.338

СРАВНЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ГИДРОЛИЗА ОРГАНОФОСФАТОВ С ХОРОШЕЙ И ПЛОХОЙ УХОДЯЩЕЙ ГРУППОЙ ФОСФОТРИЭСТЕРАЗЫ ИЗ *PSEUDOMONAS DIMINUTA*

© 2024 г. Т.И. Мулашкина^а, А.М. Кулакова^а, **А.В. Немухин**^{а, б}, М.Г. Хренова^{а, с, *}

^а Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

^б Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

^с Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

*e-mail: mkhrenova@lcc.chem.msu.ru

Поступила в редакцию 06.06.2023

После доработки 06.06.2023

Принята к публикации 10.06.2023

Комбинированным методом квантовой механики и молекулярной механики определены механизмы гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы *Pseudomonas diminuta*. Показано, что для субстрата с хорошей уходящей группой реакция проходит через две элементарные стадии с низкими энергетическими барьерами, при этом наблюдается выигрыш в энергии. В случае плохой уходящей группы возможно только образование нестабильного интермедиата реакции, однако полного гидролиза не происходит. Сравнение полученных механизмов реакции объясняет экспериментальные кинетические данные, согласно которым фермент гидролизует только субстраты с хорошими уходящими группами.

Ключевые слова: механизм реакции, фосфотриэстеразы, фосфорорганические соединения, КМ/ММ, уходящая группа.

DOI: 10.31857/S0044453724020121, EDN: RCUVJH

ВВЕДЕНИЕ

Фосфорорганические соединения (ФОС), представляющие собой триэфиры фосфатов, широко используются в качестве пестицидов, инсектицидов и антипиренов. ФОС могут накапливаться в почве и воде, а также оказывать токсичное воздействие на растения, животных и человека [1–4]. Фосфотриэстеразы – ферменты, катализирующие гидролиз фосфорорганических соединений; наиболее экспериментально изученной является фосфотриэстераза из *Pseudomonas diminuta* (Pd-РТЕ). Согласно кинетическим данным [5], Pd-РТЕ гидролизует параоксон ($k_{\text{cat}} = 2230 \text{ с}^{-1}$) и дибутил-4-нитро-фенилфосфат ($k_{\text{cat}} = 570 \text{ с}^{-1}$) и не проявляет каталитической активности с такими соединениями, как дибутилфенилфосфат и трифенилфосфат. Основное различие данных органофосфатов заключается в разном

строении уходящих групп: первые два соединения являются органофосфатами с хорошей уходящей группой, другие два – с плохой уходящей группой. В связи с этим в данной работе было проведено сравнение реакции гидролиза двух органофосфатов с одинаковыми боковыми заместителями, но разными уходящими группами: с хорошей (дибутил-4-нитрофенилфосфат (а)) и плохой (дибутилфенилфосфат (б)) уходящей группой (рис. 1).

По данным рентгеноструктурного анализа [6], в активном центре Pd-РТЕ находятся два катиона металла на расстоянии 3.9 \AA (рис. 2). Нативный фермент содержит катионы цинка. Мостиковыми лигандами для биядерного металлосодержащего центра являются гидроксид-анион и карбоксилированный остаток Lys169, атомы кислорода которых находятся на расстоянии около 2 \AA от катионов металлов. Кроме того,

катион цинка Zn_{α}^{2+} координирован в активном центре двумя аминокислотными остатками гистидина (His55, His57) и аспаратом (Asp301). Второй катион цинка Zn_{β}^{2+} также координирован двумя остатками гистидина (His201, His230). Оставшееся свободное место в его координационной сфере занимает субстрат.

Точный механизм гидролиза фосфорорганических соединений в активном центре Pd-PTE не установлен. Известно, что гидролиз органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE протекает по двухстадийному механизму. В ходе первой стадии происходит нуклеофильная атака гидроксид-анионом атома фосфора с образованием интермедиата с пентакоординированным фосфором [7–18] (рис. 3). Основные различия относятся к описанию второй стадии реакции, в ходе которой происходит разрыв связи между атомами

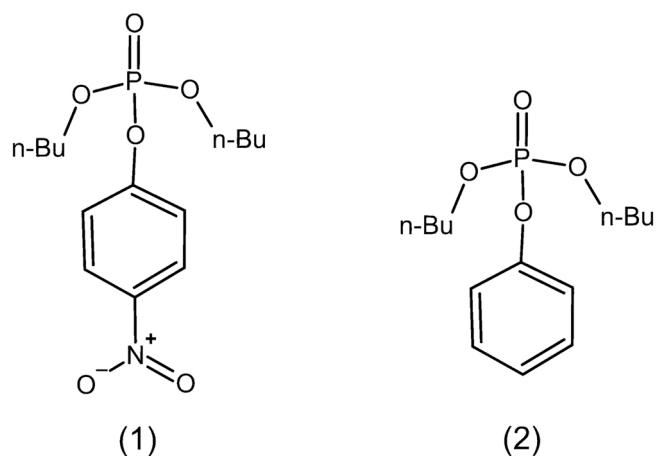


Рис. 1. Структуры субстратов: дибутил-4-нитрофенилфосфат (а) с хорошей уходящей группой и дибутилфенилфосфат (б) с плохой уходящей группой.

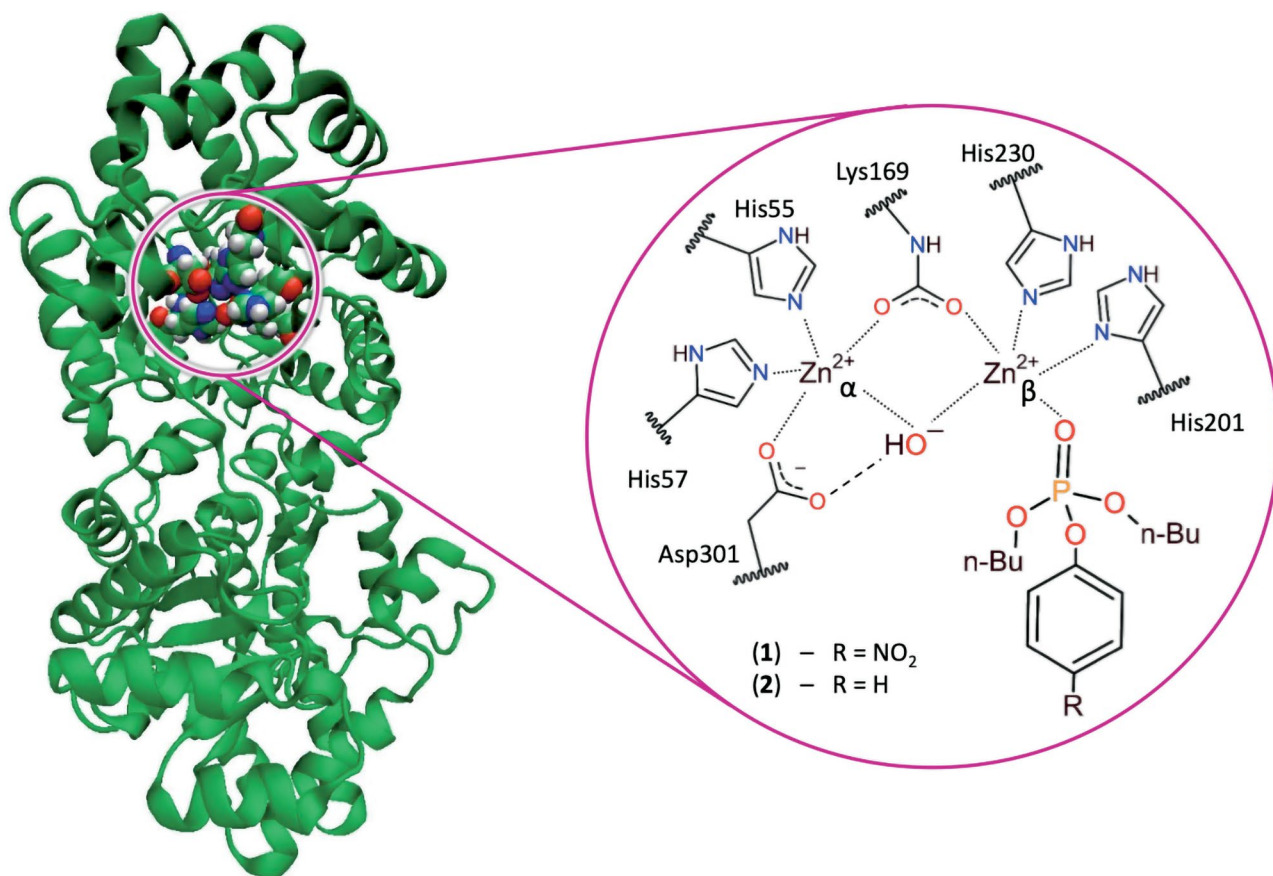


Рис. 2. Слева: Структура фосфотриэстеразы из бактерии *Pseudomonas diminuta* (Pd-PTE) – атомы активного центра показаны сферами. Справа: субстрат в активном центре Pd-PTE, пунктирными линиями показаны координационные связи катионов цинка, штриховой линией – водородная связь каталитического гидроксид аниона и аминокислотного остатка Asp301.

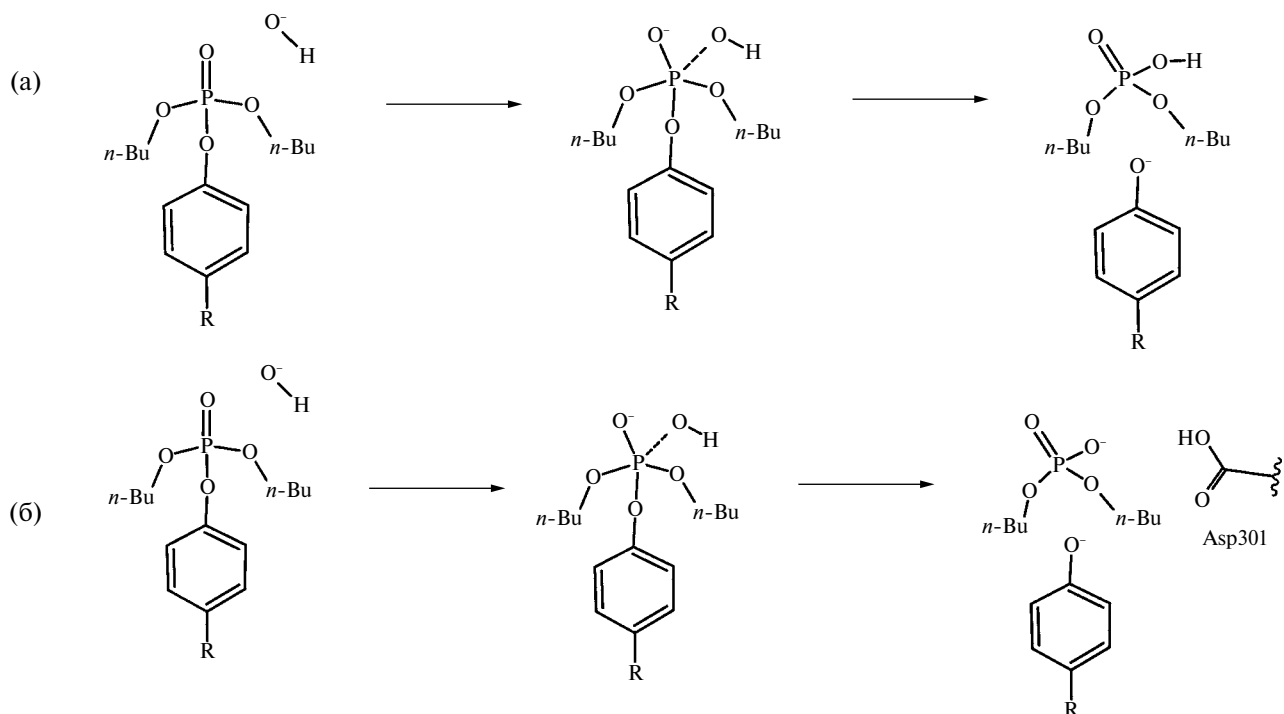


Рис. 3. Предложенные в литературе механизмы гидролиза ФОС фосфотриэстеразой Pd-PTase. Оба механизма предполагают нуклеофильную атаку гидроксид-анионом атома фосфора с образованием пентакоординированного интермедиата. Дальнейший отрыв уходящей группы сопровождается образованием P–OH-связи (в механизме (а)) или P–O-связи и переносом протона на аспарагиновую кислоту (механизм (б)).

фосфора и кислородом уходящей группы $P-O_{LG}$ с образованием комплекса фермент-продукт. На данный момент существует несколько расчетных работ [8–10, 12, 16–17], в которых обсуждается механизм гидролиза органофосфатов на примере параоксона в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTase. В работах [9, 17] утверждается, что образование комплекса фермент-продукта сопровождается переносом протона с гидроксид-аниона на аспарагиновую кислоту Asp301 (рис. 3б), тогда как в других работах [8, 10, 12] показано, что протон остается на атоме кислорода нуклеофильной частицы и впоследствии образуется протонированная форма фосфорорганического продукта (рис. 3а). Кроме того, в работе [12] была оценена относительная стабильность депротонированной и протонированной формы продукта. Анализ профиля потенциала средней силы показывает, что протонированное состояние продукта гидролиза на 5.5 ккал/моль стабильнее депротонированного.

Следует отметить, что среди перечисленных работ только в [9] комплекс фермент-продукт стабилизирован относительно фермент-субстратного комплекса. В работах [8, 10, 12]

использовался двухуровневый подход, который заключался в получении конфигураций фермента с помощью полуэмпирических методов, таких как AM1, PM3, и дальнейшей корректировке полученных энергий методом Кона – Шэма с функционалом V3LYP. Однако известно, что модели AM1 и PM3 плохо работают для фосфорсодержащих соединений [19, 20], а также для металлоферментов [21]. Развитие современных вычислительных ресурсов позволяет использовать более широкий арсенал методов DFT для описания все большего числа систем [22].

В данной работе получены механизмы реакции гидролиза органофосфатов (1) и (2) в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTase и проведено их сравнение с использованием современных подходов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Модели и методы

Начальные координаты были взяты из кристаллографических данных для димера Pd-PTase (PDB ID: 3CAK) [23], полученных с разрешением

1.8 Å. Катионы кобальта были заменены на катионы цинка в связи с тем, что цинк является нативным для фермента Pd-РТЕ. Атомы водорода были добавлены в белковую структуру с помощью программы Reduce [24] таким образом, чтобы протонированные состояния аминокислотных остатков соответствовали нейтральному рН. Отдельное внимание уделяли аминокислотным остаткам гистидина, так как в зависимости от окружения протонирование может происходить по разным атомам азота (N_δ или N_ϵ) или по двум сразу. В обоих мономерах фермента Pd-РТЕ все остатки гистидина, кроме His254, полагались нейтральными. Кроме того, в соответствии с данными РСА была проведена модификация мостикового аминокислотного остатка Lys169 на карбоксилированную форму. Данная модификация позволяет стабилизировать оба катиона Zn_α^{2+} и Zn_β^{2+} в активном центре фосфотриэстеразы. Субстраты дибутил-4-нитрофенилфосфат (**1**) и дибутилфенилфосфат (**2**) были расположены в активном центре фермента аналогично структуре комплекса фермента Pd-РТЕ с параоксоном [6]. Полученные таким образом два комплекса фермента с субстратами сольватировали, а для нейтрализации системы были добавлены три иона хлора. Подготовка полномасштабных моделей и анализ структур проводился в программном пакете VMD [25].

Для релаксации сольватной оболочки было проведено классическое молекулярно-динамическое моделирование (МД) с фиксированными атомами фермента и субстрата с помощью программного пакета NAMD [26]. Длина траектории составила 1 нс. Затем было проведено МД-моделирование без дополнительных ограничений длиной 1 нс для релаксации белкового окружения. Для описания фермента использовали силовое поле CHARMM36 [27], для субстратов (**1**) и (**2**) и карбоксилированной формы Lys169 использовали CGenFF [28], для молекулы воды – TIP3P [29]. Размер системы составил $68 \times 101 \times 90 \text{ \AA}^3$.

Далее были получены интермедиаты реакции гидролиза органофосфатов (**1**) и (**2**) в активном центре Pd-РТЕ. Для релаксации структуры под такое состояние была рассчитана молекулярно-динамическая траектория с потенциалами комбинированного метода квантовой механики / молекулярной механики (КМ/ММ-МД) продолжительностью 5 пс. Методом квантовой механики описывался активный центр

фосфотриэстеразы (рис. 2), который включает в себя катионы цинка Zn^{2+} , гидроксид-анион OH^- , боковые цепи аминокислотных остатков His55, His57, карбоксилированного Lys169, His201, His230, His254, Asp301, и органофосфат. В расчетах квантовой части использовался метод функционала электронной плотности с гибридным функционалом PBE0 [30] и дисперсионной поправкой D3 [31] и базисом 6-31G**. Катионы цинка описывались с помощью псевдопотенциалов LANL2DZ [32]. Для описания молекулярно-механической части использовалось силовое поле CHARMM36. В случае комплекса фермента Pd-РТЕ с субстратом дибутил-4-нитрофенилфосфатом (**1**) квантовая часть включала 127 атомов, а с дибутилфенилфосфатом (**2**) – 125 атомов. Общий заряд квантовой подсистемы составлял +2. Взаимодействие квантово-химического пакета TeraChem [33] и молекулярно-динамической программы NAMD [26] обеспечивалось специальным интерфейсом программы NAMD [34].

Все расчеты методом молекулярной динамики были выполнены в каноническом ансамбле NPT при $p = 1 \text{ атм}$ и $T = 300 \text{ К}$, которые поддерживались с использованием баростата Ноэ – Гувера [35] и термостата Ланжевена [36] с шагом интегрирования 1 фс.

Для получения сечения поверхности потенциальной энергии (ППЭ) вдоль координаты реакции был проведен ряд последовательных оптимизаций геометрий с фиксированным значением координаты реакции через равные промежутки в рамках стационарного метода КМ/ММ. В связи с тем, что реакция гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы происходит в две стадии, в качестве координат реакции были выбраны расстояния между фосфором и кислородом нуклеофила ($P-O_{Nu}$) и между фосфором и кислородом уходящей группы ($P-O_{LG}$) для первой и второй стадии соответственно.

Для этого были взяты интермедиаты реакции гидролиза соединений (**1**) и (**2**) в активном центре Pd-РТЕ, полученные из КМ/ММ-МД, в сольватной оболочке, ограниченной молекулами воды, расположенными на расстоянии не более 4 Å от макромолекулы белка и субстрата. Оптимизация КМ/ММ была выполнена с использованием программного обеспечения Tcl ChemShell [37] с эффективным

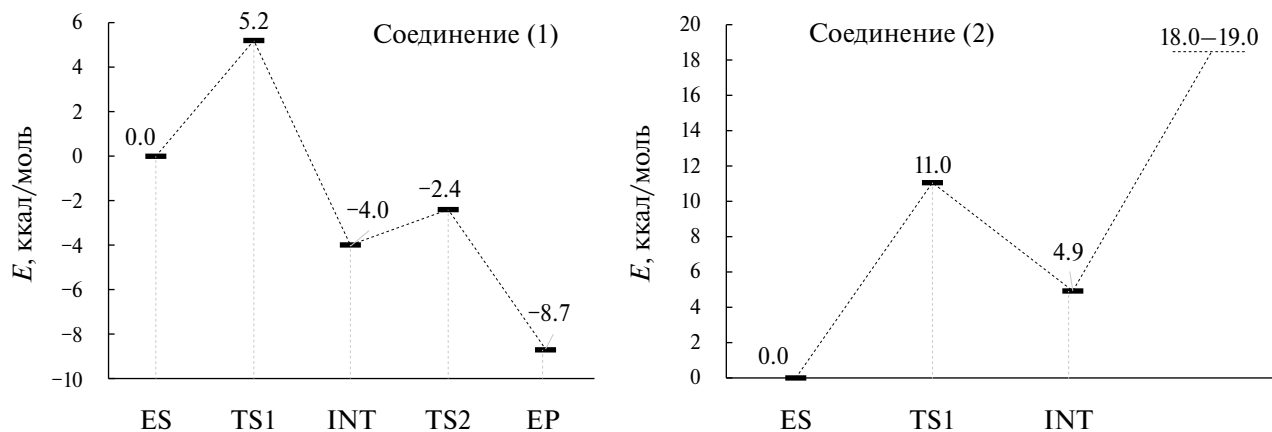


Рис. 4. Сечения поверхности потенциальной энергии для реакции гидролиза: а – дибутил-4-нитрофенилфосфата (1) и б – дибутилфенилфосфата (2) в активном центре фосфотриэстеразы Pd-РТЕ. ES – фермент-субстратный комплекс, TS1 и TS2 – переходные состояния, INT – интермедиат, EP – комплекс фермент-продукт.

оптимизатором DL-FIND [38] и программным пакетом квантовой химии TURBOMOLE [39]. Квантовая подсистема и методы ее описания были выбраны аналогично предыдущему этапу.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На рис. 4 показаны сечения поверхности потенциальной энергии вдоль координаты реакции, полученные методом КМ/ММ для реакции гидролиза двух выбранных субстратов в активном центре Pd-РТЕ. Гидролиз дибутил-4-нитрофенилфосфата (1) – органофосфата с хорошей уходящей группой – протекает с невысокими барьерами. Барьер образования интермедиата составляет 5.2 ккал/моль, а переход из интермедиата в продукт – 1.6 ккал/моль. Помимо низких барьеров эффективность протекания реакции обеспечивается понижением относительной энергии каждого следующего интермедиата. Гидролиза дибутилфенилфосфата (2) – органофосфата с плохой уходящей группой – не происходит, в том числе не удастся локализовать энергетический минимум, отвечающий комплексу фермент-продукт: начиная со значения координаты реакции P-O_{LG}, равной 3.2 Å, значения относительной энергии выходят на плато и составляют 18-19 ккал/моль. Таким образом, фосфотриэстераза Pd-РТЕ проявляет каталитическую эффективность только по отношению к органофосфату с хорошей уходящей группой. Полученные результаты согласуются с кинетическими данными [5], которые показывают, что каталитическая активность

Pd-РТЕ для гидролиза дибутилфенилфосфата снижается в 10⁶ раз по сравнению с гидролизом дибутил-4-нитрофенилфосфата.

Установленный механизм протекания реакции гидролиза дибутил-4-нитрофенилфосфата приведен на рис. 5. Гидролиз начинается с нуклеофильной атаки гидроксид-анионом атома фосфора органофосфата, что приводит к образованию интермедиата с пентакоординированным фосфором (INT). Затем происходит разрыв P-O_{LG} связи, которая сопровождается переносом протона с кислорода гидроксид-аниона на остаток аспаргиновой кислоты (Asp301). Данный механизм согласуется с работами [9, 17]. Кинетическая роль Asp301 согласуется с работой [18], в которой сравнение кинетических параметров для фермента дикого типа и мутантных форм показало, что замена заряженной аспарагиновой кислоты на незаряженные аланин или аспарагин приводит к падению каталитической активности. На основании экспериментальных данных и установленного механизма можно предположить, что перенос протона на аспарагиновую кислоту является важной частью механизма реакции гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы Pd-РТЕ.

На рис. 6 представлены стационарные точки для первой стадии гидролиза дибутилфенилфосфата. Структуры фермент-субстратных комплексов и интермедиатов для гидролиза дибутил-4-нитрофенилфосфата и дибутилфенилфосфата схожи. В фермент-субстратных комплексах расстояние нуклеофильной

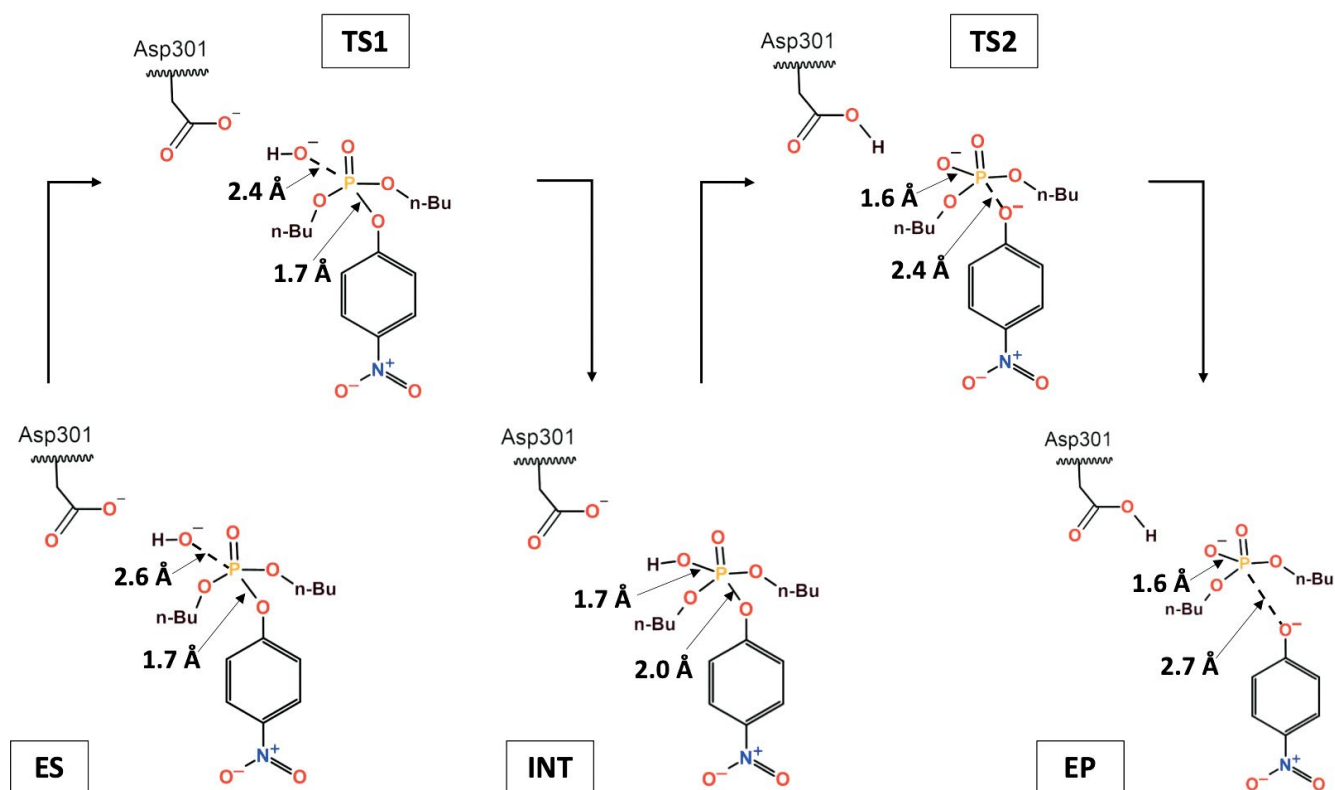


Рис. 5. Механизм реакции гидролиза дибутил-4-нитрофенилфосфата в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE. ES – фермент-субстратный комплекс, TS1 и TS2 – переходные состояния, INT – интермедиат, EP – комплекс фермент-продукт.

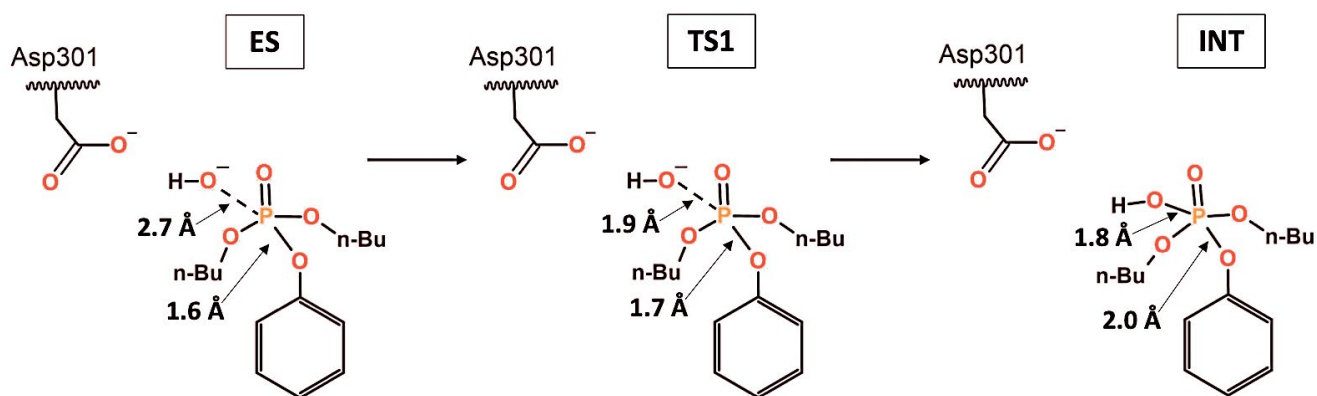


Рис. 6. Первая стадия реакции гидролиза дибутилфенилфосфата в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE. ES – фермент-субстратный комплекс, TS1 – переходное состояние, INT – интермедиат.

атаки составляет 2.6 и 2.7 Å соответственно. Образование интермедиатов сопровождается уменьшением расстояния между фосфором и кислородом гидроксид-аниона до 1.7 и 1.8 Å, а расстояние P-O_{LG} составляет 2.0 Å. Существенные различия наблюдаются в структурах первого переходного состояния: в случае дибутилфенилфосфата нуклеофил подходит на более короткое расстояние (1.9 Å), чем в случае

дибутил-4-нитрофенилфосфата (2.4 Å). Несмотря на это, дальнейшего разрыва связи P-O_{LG} в дибутилфенилфосфате не происходит.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе построены профили потенциальной энергии реакции гидролиза органофосфатов фосфотриэстеразой Pd-PTE. Для субстрата

с хорошей уходящей группой реакция проходит в две стадии с низкими энергетическими барьерами, при этом каждый последующий минимум на поверхности потенциальной энергии стабилизирован относительно предыдущего, что обеспечивает экспериментально наблюдаемое эффективное прохождение химической реакции. В случае негидролизуемого субстрата с плохой уходящей группой профиль потенциальной энергии характеризуется дестабилизированным состоянием, отвечающим интермедиату реакции. Вторая стадия реакции не происходит: разрыв связи с уходящей группой приводит к повышению энергии на 18–19 ккал/моль относительно фермент-субстратного комплекса (реагентов).

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 21-33-70001). Расчеты проведены с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова и Межведомственного суперкомпьютерного центра РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Tsai P.C., Fox N., Bigley A.N. et al. // Biochemistry. 2012. Т. 51. № 32. С. 6463. DOI: 10.1021/bi300811t*
- Reemtsma T., García-López M., Rodríguez I. et al. // TrAC. 2008. Т. 27. № 9. С. 727. DOI: 10.1016/j.trac.2008.07.002*
- Du J., Li H., Xu S. et al. // Environ. Sci. Pollut. Res. 2019. Т. 26. С. 22126. DOI: 10.1007/s11356-019-05669-y*
- Stubbings W.A., Schreder E.D., Thomas M.B. et al. // Environ. Pollut. 2018. Т. 238. С. 1056. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.03.083*
- Xiang D.F., Bigley A.N., Ren Z. et al. // Biochemistry. 2015. Т. 54. С. 7539. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b01144*
- Vanhoose J.L., Benning M.M., Raushel F.M., Holden H.M. // Biochemistry. 1996. Т. 35. С. 6020. DOI: 10.1021/bi9603251*
- Grimsley J.K., Calamini B., Wild J.R., Mesecar A.D. // Arch. of Bioch. and Biophys. 2005. Т. 442. № 2. С. 169. DOI: 10.1016/j.abb.2005.08.012*
- Zhang X., Wu R., Song L. et al. // J. Comput. Chem. 2009. Т. 30. № 15. С. 2388–2401. DOI: 10.1002/jcc.21238*
- Chen Sh.-L., Fang W.-H., Himo F. // J. Phys. Chem. B. 2007. Т. 111. № 6. С. 1253. DOI: 10.1021/jp068500n*
- Wong K.-Y., Gao J. // Biochemistry. 2007. Т. 46 № 46. С. 13352–13369. DOI: 10.1021/bi700460c*
- Jackson C.J., Foo J.-L., Kim H.-K. et al. // J. Mol. Biol. Т. 375. № 5. С. 1189–1196. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.10.061*
- López-Canut V., Ruiz-Pernía J.J., Castillo R. et al. // Chem. Europ. J. 2012. Т. 18. № 31. С. 9612. DOI: 10.1002/chem.201103615*
- Bigley A.N., Raushel F.M. // Biochim. Biophys. Acta. 2013. Т. 1834. № 1. С. 443. DOI: 10.1016/j.bbapap.2012.04.004*
- Kim J., Tsai P.-Ch., Chen Sh.-L. et al. // Biochemistry. 2008. Т. 47. № 36. С. 9497. DOI: 10.1021/bi800971v*
- Jackson C., Kim H.-K., Carr P.D. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2005. Т. 1752. № 1. С. 55. DOI: 10.1016/j.bbapap.2005.06.008*
- Bora R.P., Mills M.J.L., Frushicheva M.P., Warshel A. // J. Phys. Chem. B. 2015. Т. 119. № 8. С. 3434. DOI: 10.1021/jp5124025*
- Yuzhuang F., Fan F., Wang B., Cao Z. // Chem.: Asian J. 2022. Т. 17. № 14. e202200439. DOI: 10.1002/asia.202200439*
- Aubert S.D., Li Y., Raushel F.M. // Biochemistry. 2004. Т. 43. № 19. С. 5707. DOI: 10.1021/bi0497805*
- Nam K., Cui Q., Gao J., York D.M. // J. Chem. Theory Comput. 2007. Т. 3. № 2. С. 486. DOI: 10.1021/ct6002466*
- Lopez X., York D.M. // Theor. Chem. Ac. Т. 2003. 109. С. 149. DOI: 10.1007/s00214-002-0422-2*
- Bräuer M., Kunert M., Dinjus E. et al. // J. Mol. Struct.: THEOCHEM. 2000. Т. 505. № 1–3. С. 289. DOI: 10.1016/S0166-1280(99)00401-7*
- Mardirossian N., Head-Gordon M. // Mol. Phys. 2017. Т. 115. № 19. С. 2315. DOI: 10.1080/00268976.2017.1333644*
- Kim J., Tsai P. C., Chen S. L. et al. // Biochemistry. 2008. Т. 47. С. 9497. DOI: 10.1021/bi800971v*
- Word J.M., Lovell S.C., Richardson J.S., Richardson D.C. // J. Mol. Biol. 1999. Т. 285. С. 1735. DOI: 10.1006/jmbi.1998.2401*
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // J. Mol. Graph. 1996. Т. 14. С. 33. DOI: 10.1016/0263-7855(96)00018-5*

26. *Phillips J.C., Braun R., Wang W. et al.* // *J. Comput. Chem.* 2005. Т. 26. С. 1781. DOI: 10.1002/jcc.20289
27. *Best R.B., Zhu X., Shim J. et al.* // *J. Chem. Theory Comput.* 2012. Т. 8. С. 3257. DOI: 10.1021/ct300400x
28. *Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C. et al.* // *J. Comput. Chem.* 2009. Т. 31. С. 671. DOI: 10.1002/jcc.21367
29. *Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D. et al.* // *J. Chem. Phys.* 1983. Т. 79. С. 926. DOI: 10.1063/1.445869
30. *Adamo C., Barone V.* // *J. Chem. Phys.* 1999. Т. 110. С. 6158. DOI: 10.1063/1.478522
31. *Grimme S., Antony J., Ehrlich S., Krieg H.* // *J. Chem. Phys.* 2010. Т. 132. С. 154104. DOI: 10.1063/1.3382344
32. *Hay P.J., Wadt W.R.* // *J. Chem. Phys.* 1985. Т. 82. № 1. С. 299. DOI: 10.1063/1.448975
33. *Seritan S., Bannwarth C., Fales B.S. et al.* // *WIREs Comput. Mol. Sci.* 2021. Т. 11. e1494. DOI: 10.1002/wcms.1494.
34. *Melo M.C.R., Bernardi R.C., Rudack T. et al.* // *Nat. Methods.* 2018. Т. 15. С. 351–354. DOI: 10.1038/nmeth.4638
35. *Martyna G.J., Klein M.L.* // *J. Chem. Phys.* 1992. Т. 97. № 4. С. 2635. DOI: 10.1063/1.463940
36. *Singer K., Smith W.* // *Mol. Phys.* 1988. Т. 64. № 6. С. 1215. DOI: 10.1080/00268978800100823
37. *Lu Y., Farrow M.R., Fayon P. et al.* // *J. Chem. Theory Comput.* 2019. Т. 15(2). P. 1317. DOI: 10.1021/acs.jctc.8b01036
38. *Kästner J., Carr J.M., Keal T.W., Thiel W.* // *J. Phys. Chem. A.* 2009. Т. 113. № 43. С. 11856. DOI: 10.1021/jp9028968
39. *Ahlrichs R., Bar M., Iser M.H. et al.* // *Chem. Phys. Lett.* 1989. Т. 162. № 3. С. 165. DOI: 10.1016/0009-2614(89)85118-8