**Моделирование ферментативной активности бутирилхолинэстеразы с измененной каталитической триадой: появление гидролазной активности**

***Блинова А.Р.1, Григоренко Б.Л.1***

*Аспирант, 1 год обучения*

*1Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,*

*химический факультет, Москва, Россия*

*E-mail:* *lady.buka-zluka2016@yandex.ru*

Холинэстеразы, а в особенности ацетилхолинэстераза, представляют собой ключевые ферменты холинергической системы. Их необратимое ингибирование фосфорорганическими соединениями (ФО) вызывает холинергический криз, сопровождающийся периферическим параличом и дыхательной недостаточностью. Несмотря на десятилетия исследований, эффективность как профилактики, так и лечения отравления ФО остается неудовлетворительной. На роль нового терапевтического средства были предложены белки, способные катализировать распад ФО или стехиометрически их связывать. В начале 90-х было выдвинуто предположение, что человеческая бутирилхолинэстераза (BChE) может быть трансформирована в гидролазу ФО, если модифицировать ее таким образом, чтобы молекулы воды, присутствующие в ее активном центре, могли атаковать атом фосфора аддукта, который получается при реакции между серином из каталитической триады фермента и ФО. Мутанты BChE, которые обладали бы высокой ФО гидролазной активностью, однако, до сих пор неизвестны. В нашей работе мы предлагаем подобный мутант и характеризуем его с помощью методов молекулярного моделирования и квантовой химии.

В качестве модельного ФО использовали экотиофат, препарат от глаукомы, обладающий такой же P-S связанной уходящей группой, что и боевые отравляющие вещества V-агенты. Предложенный мутант BChE Glu325Gly/Asn322Glu является результатом модификации первоначальной каталитической триады Ser198-His438-Glu325 с целью изменить угол наклона плоскости кольца гистидина и экспанировать его для молекул воды активного центра.

Молекулярно-динамическое моделирование с силовым полем CHARMM36 показывает, что новая каталитическая триада не менее устойчива, чем нативная. С помощью комбинированного метода квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ) и молекулярной динамики с КМ/ММ потенциалами (КМ/ММ-МД) с добавлением смещающего потенциала методом зонтичной выборки (umbrella sampling) были построены профили энергии Гиббса реакции нативной и мутантной BChE с экотиофатом. Одинаковый двухстадийный механизм, а также сходные значения энергетических барьеров отдельных стадий для двух белков позволяют утверждать, что предложенная каталитическая триада не только стабильна, но и каталитически активна. Таким образом, возможен дальнейший поиск мутантов BChE с заменами аминокислот каталитической триады.

Для мутантной BChE был также построен профиль энергии Гиббса реакции гидролиза аддукта, полученного при взаимодействии с экотиофатом. Предложенный механизм включает две стадии, величины соответствующих энергетических барьеров составляют 14 и 3.5 ккал/моль, а энергии стабилизации интермедиата и продукта – 8 и 6.5 ккал/моль. Полученные энергетические характеристики не выходят за пределы ожидаемых для ферментативной реакции, а значит, предложенный мутант BChE может служить в качестве ФО гидролазы.

*Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова при финансовой поддержке РФФИ (проект № 23-13-00011).*