

## NGHIÊN CỨU LÝ THUYẾT HOẠT TÍNH XÚC TÁC CỦA AXETYLCHOLINESTERASE Ở NGƯỜI

Nguyễn Hữu Thọ\*, Tống Thị Thu Cúc

*Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội*

Đến Tòa soạn 15-7-2014; Chấp nhận đăng 13-2-2015

### Abstract

Homo sapiens' acetylcholinesterase was docked with the substrate (acetylcholine) to find the most favorite binding sites. The state in which acetylcholine is located above Ser(203) in the active site gorge has the lowest binding energy. The mechanism of the hydrolysis of acetylcholine (a neurotransmitter) catalyzed by Homo sapiens' enzyme was verified on structure and energy using QM/MM method. Structures of intermediates (state when substrate approaches active site, enzyme - substrate complex, and state when choline is eliminated) were optimized. The transition states were located with the estimation for the activation energy was 11.943 kcal/mol for the formation of enzyme - substrate complex, and 0.032 kcal/mol for the elimination of choline.

**Keywords.** Acetylcholine, acetylcholinesterase, mechanism, QM/MM.

### 1. MỞ ĐẦU

Axetylcholinesterase thuộc nhóm enzym esterase (thủy phân chức este). Axetylcholinesterase thực hiện chức năng thủy phân acetylcholine (có công thức  $\text{CH}_3\text{COO}(\text{CH}_2)_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ) là chất dẫn truyền xung thần kinh trong cơ thể nhiều loài khác nhau. Sau khi tín hiệu được truyền đi, axetylcholine phải được thủy phân để tín hiệu không bị chồng lấn. Do đó, axetylcholinesterase có vai trò đặc biệt quan trọng. Bài báo này đề cập đến phản ứng thủy phân axetylcholine nhờ enzym ở người.

Qua nhiều thực nghiệm, cấu trúc của acetylcholinesterase ở người đã được phân tích chi tiết và tâm xúc tác được xác định nằm trên Ser(203), His(447). Dưới tác dụng của enzym và nước, axetylcholine được thủy phân thành axit acetic và choline. Đây là một trong những phản ứng có tốc độ nhanh nhất. Trong đó, Ser(203) có vai trò như một tác nhân nucleophilin đối với nhóm axetyl của acetylcholine, His(447) đóng vai trò như một xúc tác axit - bazơ [1, 3]. Trong giai đoạn đầu (giai đoạn acyl hóa), axetylcholine tiếp cận tâm phản ứng, tạo phức enzym - cơ chất rồi tách choline, để lại nhóm axetyl liên kết với enzym tại vị trí Ser(203). Trong giai đoạn tái tạo enzym (deacyl hóa), với sự tham gia của nước, axetyl enzym bị thủy phân tạo thành axit acetic và enzym.

### 2. PHƯƠNG PHÁP

Để xác định vị trí gắn kết thuận lợi của cơ chất acetylcholine lên enzym, tác giả sử dụng phương pháp cơ học phân tử kết hợp với thuật toán tìm cực trị toàn cục Monte Carlo [5]. Các tính toán docking được thực hiện trên phần mềm AutoDock Vina. Kết quả này được sử dụng làm định hướng cho tính toán QM/MM tiếp theo.

Kết quả docking với năng lượng được đánh giá theo cơ học phân tử chưa thể hiện được tương tác hóa học giữa enzym và cơ chất. Đối với hệ phản ứng xúc tác enzym, do số lượng nguyên tử lớn, sử dụng phương pháp lượng tử để tính cho toàn bộ hệ phản ứng là điều không khả thi. Các phương pháp cơ học phân tử đơn giản, cho kết quả nhanh nhưng không thể áp dụng cho các trường hợp có sự phá vỡ hay hình thành liên kết hóa học. Trong phản ứng xúc tác enzym, chỉ có một phần nhỏ trong phân tử enzym tham gia trực tiếp vào quá trình hình thành, phá vỡ liên kết hóa học cần mô tả bằng các phương pháp lượng tử. Phần còn lại của enzym chủ yếu ảnh hưởng thông qua tương tác tĩnh điện, liên kết hydro, các tương tác Van der Waals yếu, có thể mô tả qua các tham số trường lực cơ học phân tử. Để đảm bảo cân bằng giữa độ chính xác và khối lượng, thời gian tính toán, phương pháp kết hợp giữa cơ học lượng tử và cơ học phân tử (QM/MM) được sử dụng rộng rãi cho các phản ứng xúc tác enzym.

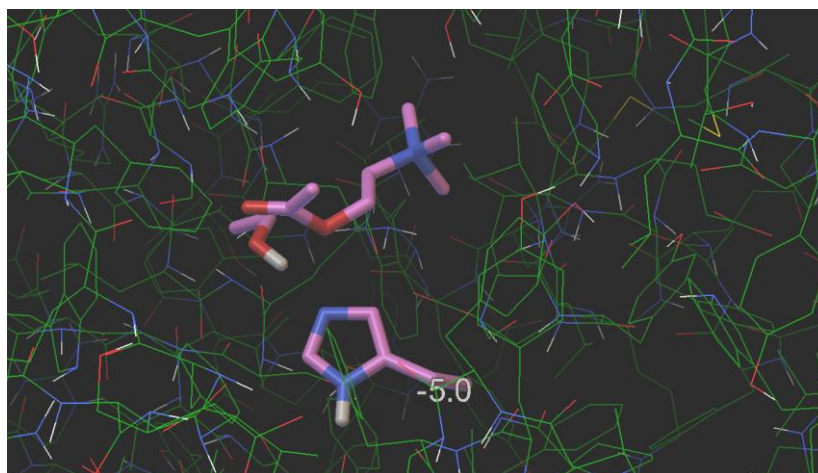
Trong bài báo này, tác giả sử dụng phương pháp QM/MM (EE) để tính toán cho hệ phản ứng thủy

phân axetylcholin nhờ xúc tác enzym (acetylcholinesterase) ở người. Cấu trúc enzym được lấy từ cơ sở dữ liệu RCSB, mã 4EY4. Phân tử acetylcholine được tối ưu và đưa vào hốc phản ứng. Phần tâm hoạt động (Ser203, nhánh của His447) và acetylcholine được tính theo phương pháp DFT, phiếm hàm B3LYP, bộ hàm cơ sở 6-31G(d). Phần

còn lại của enzym và các phân tử H<sub>2</sub>O được tính bằng phương pháp cơ học phân tử với trường lực AMBER. Các tham số trường lực còn thiếu được bổ sung dùng trường lực GAFF (trùng hợp với trường lực AMBER) sử dụng Antechamber. Các tính toán được thực hiện trên phần mềm Gaussian 09 sử dụng ONIOM hai lớp.

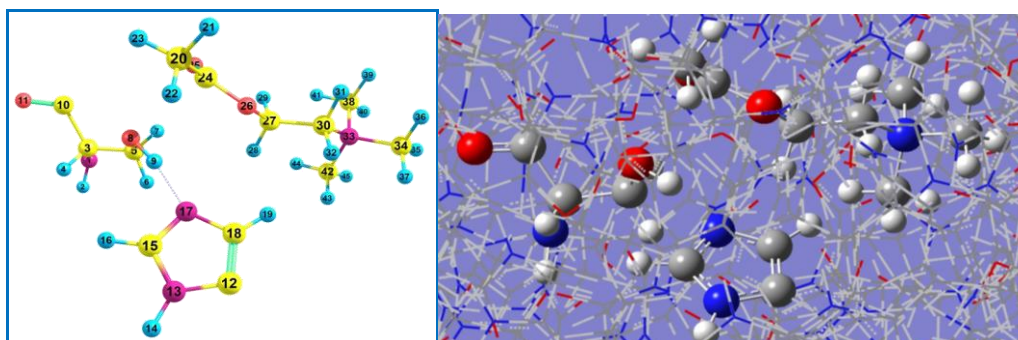
### 3. KẾT QUẢ

Kết quả docking cho trạng thái có năng lượng gắn kết âm nhất (-5,0 kcal/mol) trên hình 1.



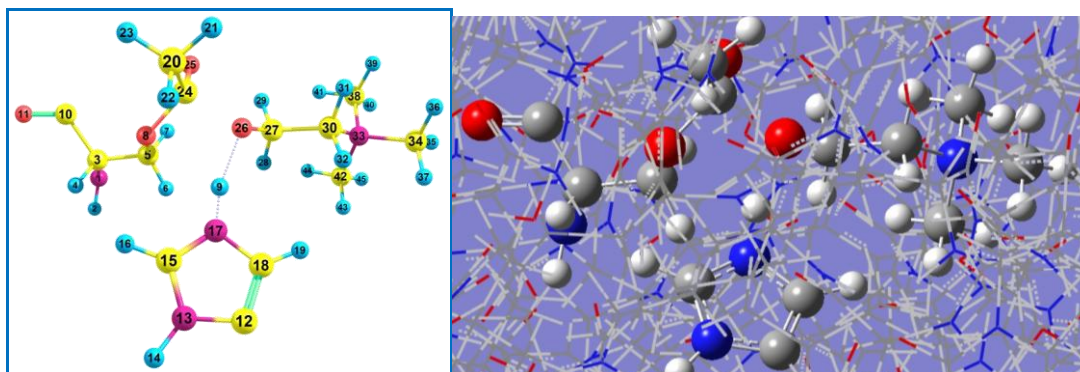
Hình 1: Trạng thái docking có năng lượng gắn kết âm nhất

Tối ưu cấu trúc hệ phản ứng khi acetylcholine tiếp cận tâm xúc tác cho kết quả trên hình 2.



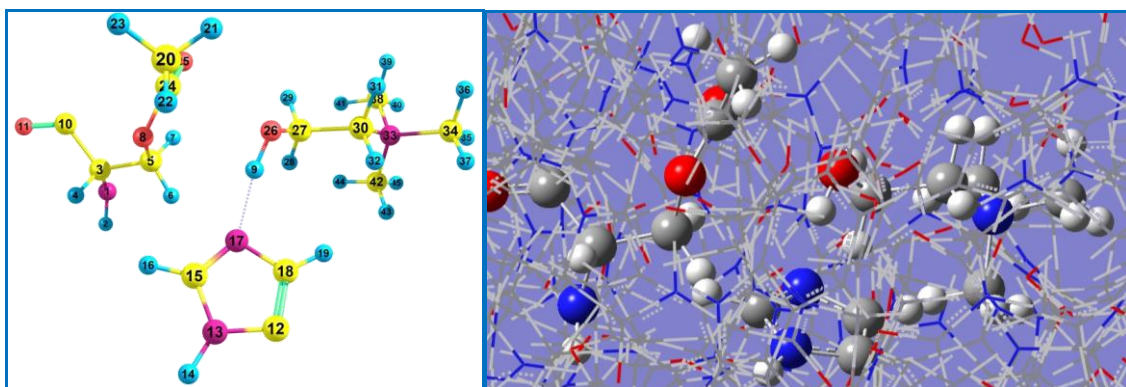
Hình 2: Cấu trúc trạng thái axetylcholine tiếp cận tâm xúc tác (INT1)

Cấu trúc trạng thái phức được tối ưu theo phương pháp QM/MM cho kết quả trên hình 3.



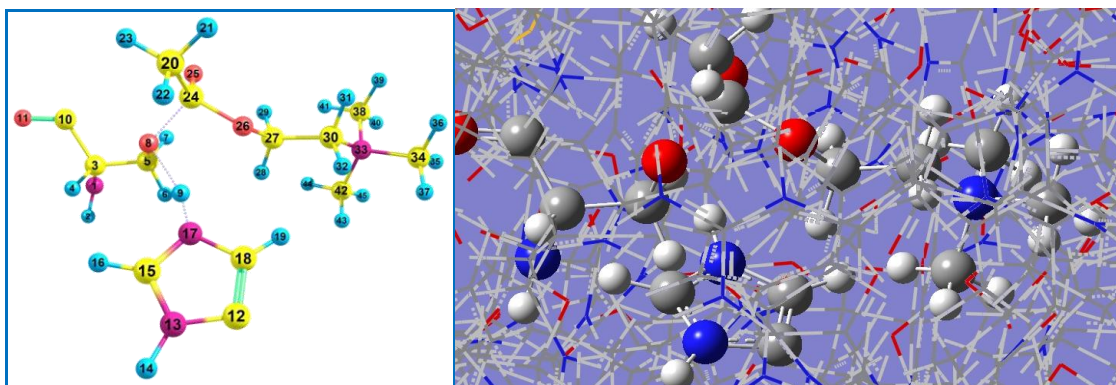
Hình 3: Cấu trúc trạng thái phức (INT2)

Kết quả tối ưu cấu trúc trạng thái tách choline (hình 4).



Hình 4: Cấu trúc trạng thái tách choline (INT3)

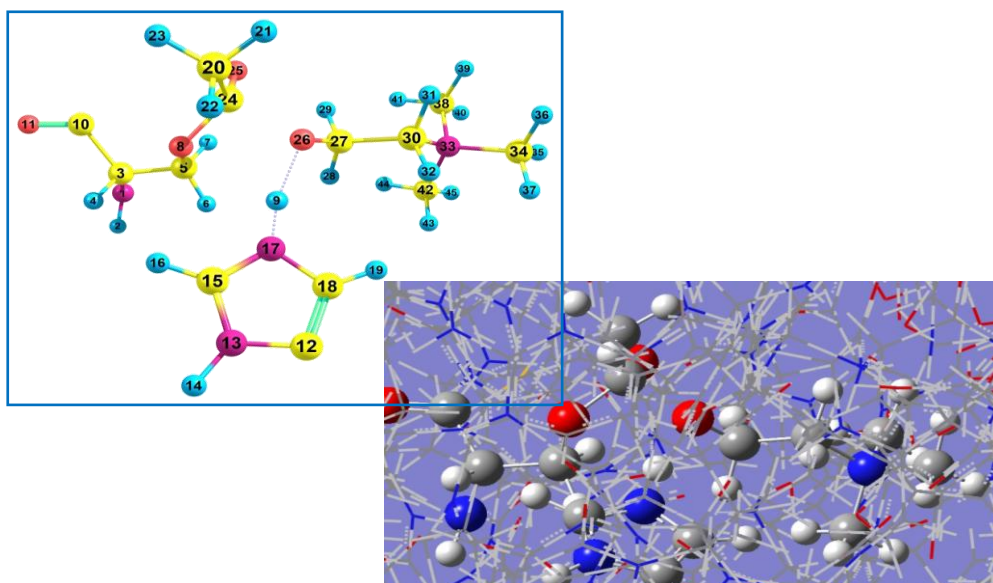
Để khoan vùng cấu trúc trạng thái chuyển tiếp giai đoạn tạo phức, quét thể theo khoảng cách C(24) - O(6). Hình 5 là kết quả khoan vùng cấu trúc trạng thái chuyển tiếp giai đoạn tạo phức.



Hình 5: Cấu trúc trạng thái chuyển tiếp giai đoạn tạo phức (TS1)

Năng lượng hoạt hóa giai đoạn tạo phức là 11,943 kcal/mol.

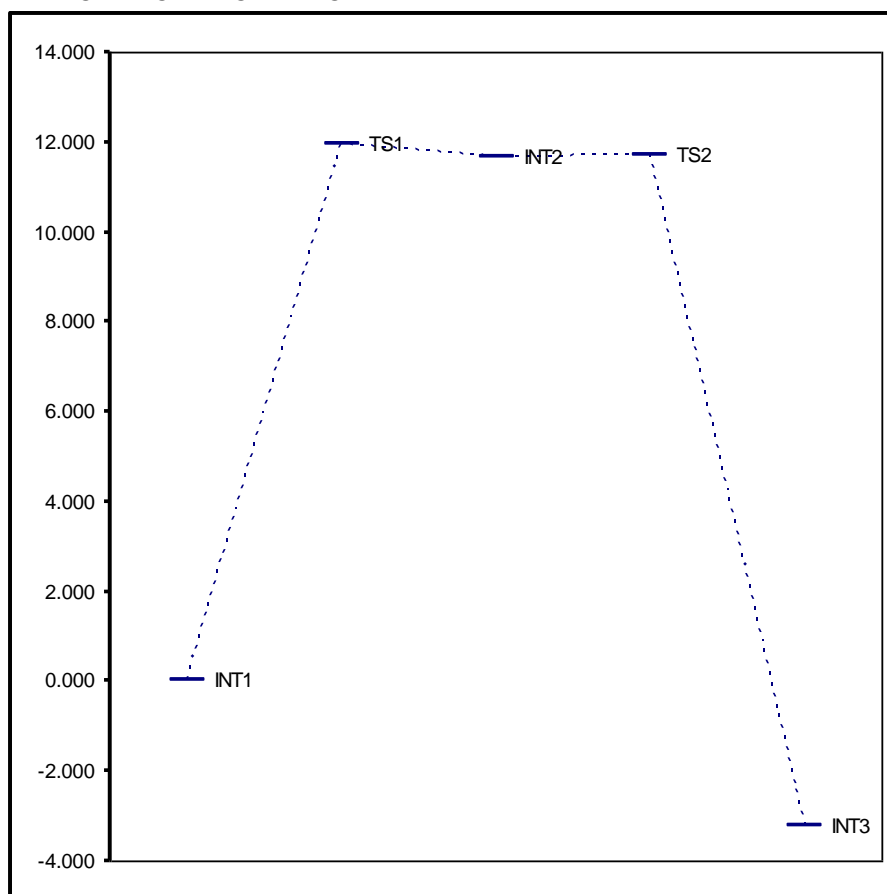
Trong giai đoạn tách choline quét thể theo tọa độ N(11)-H(14), khoan vùng được cấu trúc trạng thái chuyển tiếp như trên hình 6.



Hình 6: Cấu trúc trạng thái chuyển tiếp giai đoạn tách choline (TS2)



Năng lượng hoạt hóa giai đoạn tách choline: 0,032 kcal/mol.  
Sơ đồ biến đổi năng lượng chung cho 2 giai đoạn (hình 7).



Hình 7: Sơ đồ biến đổi năng lượng chung của quá trình tạo phức và tách choline

#### 4. THẢO LUẬN

Trong trạng thái gắn kết với năng lượng âm nhất (hình 1), phân tử axetylcholin nằm trong hốc phản ứng, nhóm axetyl tiếp cận với tâm xúc tác trên Ser(203), nhóm OH của Ser(203) định hướng về phía N trong vòng imidazol của His(447). Phần gốc amin bậc 4 -N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> hướng về phía vòng indol của Trp(86). Định hướng này phù hợp với kết quả phân tích trong tài liệu [1, 2].

Với kết quả định hướng từ tính toán docking, tối ưu cấu trúc trạng thái giai đoạn acetylcholine tiếp cận tâm xúc tác bằng phương pháp QM/MM (hình 2) xác nhận lại định hướng của phân tử axetylcholine trong hốc phản ứng. Khoảng cách giữa axetylcholine và tâm xúc tác (tính bằng khoảng cách giữa C(24) và O(8) bằng 2,66 Å. Với khoảng cách này, acetylcholin chưa thể hiện tương tác hóa học với tâm xúc tác. Khoảng cách giữa H(9) và N(17) bằng 1,67 Å, thể hiện liên kết hydro mạnh.

Tối ưu trạng thái phức thu được cấu trúc tứ diện (hình 2). Liên kết O(8) - C(24) có độ dài 1,48 Å,

khoảng cách giữa C(24) và O(26) là 1,67 Å, lớn hơn độ dài của liên kết đơn C-O. Góc nhị diện C(20)-C(24)-O(25)-O(26) bằng 116°, lệch nhiều so với cấu trúc phẳng của chức este (180°). Nguyên tử H(9) chuyển sang N(17) và định hướng giữa N(17), O(26) với độ dài liên kết N(17) - H(9) bằng 1,07 Å, khoảng cách H(9) và O(26) là 1,56 Å (trong vùng liên kết hydro mạnh). Định hướng này thuận lợi cho giai đoạn tách choline tiếp theo.

Quét thể khi axetylcholin lại gần tâm xúc tác (giảm khoảng cách C(24) và O(8) từ trạng thái INT1 đến INT2) cho thấy có sự dịch chuyển đồng thời của nguyên tử H(9) từ O(8) sang N(17) và định hướng về phía O(26). Trong trạng thái chuyển tiếp TS1 (hình 5) đã hình thành cấu trúc tứ diện. Khoảng cách giữa O(8) và C(24) bằng 1,6 Å, góc nhị diện C(20) - C(24) - O(25) - O(26) bằng 125°. Khoảng cách O(8) và H(9) bằng 1,63 Å, giữa H(9) và N(17) bằng 1,06 Å. Với khoảng cách này có thể coi như H(9) đã chuyển sang vòng pirimidin của His(447).

Trong trạng thái tách choline (INT3) trên hình 4, nhóm axetyl liên kết chặt hơn với tâm xúc tác (độ

dài liên kết C(24) và O(8) bằng 1,35 Å. Phân tử acetylcholine bị phân tách hoàn toàn với khoảng cách O(26) và C(24) bằng 2,62 Å, và nguyên tử H(9) chuyển hẳn sang liên kết với O(26). Độ dài liên kết O(26) - H(9) bằng 0,99 Å.

Quét thể khi H(9) chuyển từ N(17) sang O(26) thấy sự chuyển dịch đồng thời của O(26) xa khỏi C(24). Năng lượng trong quá trình này chỉ tăng lên trong khoảng rất nhỏ (0,032 kcal/mol).

So sánh năng lượng giữa trạng thái phức (INT2) và trạng thái axetylcholin tiếp cận tâm xúc tác (INT1) thấy chênh lệch năng lượng chỉ tính riêng cho vùng QM ( $\Delta E(QM) = 12,854$  kcal/mol) cao hơn so với chênh lệch năng lượng giữa hai trạng thái ( $\Delta E = 11,679$  kcal/mol). So sánh giữa trạng thái chuyển tiếp TS1 và trạng thái INT1 cũng cho nhận xét tương tự ( $\Delta E(QM) = 13,914$  kcal/mol;  $\Delta E = 11,943$  kcal/mol). Như vậy, có thể thấy enzym có hiệu ứng làm bền trạng thái phức và trạng thái chuyển tiếp TS1 lớn hơn so với trạng thái INT1.

Trong giai đoạn tách choline, so sánh giữa trạng thái tách cholin (INT3) với trạng thái phức (INT2) thu được kết quả:  $\Delta E(QM) = -1,404$  kcal/mol cao hơn  $\Delta E = -14,892$  kcal/mol. So sánh giữa trạng thái chuyển tiếp TS2 với trạng thái phức:  $\Delta E(QM) = 0,857$  kcal/mol cao hơn  $\Delta E = 0,032$  kcal/mol. Qua các số liệu trên có thể thấy, enzym có hiệu ứng làm bền mạnh hơn cho trạng thái tạo phức, tách choline và các trạng thái chuyển tiếp, đặc biệt là đối với trạng thái tách cholin.

Xét tổng thể, năng lượng hoạt hóa chung cho cả hai giai đoạn là 11,943 kcal/mol (hình 9). Mức năng lượng này phù hợp với tốc độ diễn biến của phản ứng và sai số của phương pháp tính [3].

## 5. KẾT LUẬN

Trong bài báo này, tác giả đã sử dụng phương pháp QM/MM(EE) để tính toán cho hệ phản ứng

thủy phân acetylcholine nhờ xúc tác enzym ở người (theo cơ chế được đề xuất từ thực nghiệm), thu được kết quả về sự biến đổi cấu trúc và năng lượng của hệ. Năng lượng hoạt hóa cho giai đoạn tạo phức và giai đoạn tách choline lần lượt là 11,943 kcal/mol và 0,032 kcal/mol. Phân tích kết quả về năng lượng cho thấy hiệu ứng làm bền của enzym đối với các trạng thái trung gian và trạng thái chuyển tiếp trong tiến trình phản ứng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Yves Bourne, Palmer Taylor, Zoran Radic, Pascale Marchot. *Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site*, The EMBO Journal, **22(1)**, 1-12 (2003).
2. Jacques-Philippe Colletier et al. *Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase*, The EMBO Journal, **25(12)**, 2746-2756 (2006).
3. Daniel M. Quinn. *Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition States*, Chemical Reviews, **87(5)**, 955-979 (1987).
4. Joel L. Sussman et al. *Atomic Structure of Acetylcholinesterase from Torpedo californica: A Prototypic Acetylcholine-binding protein*, Science, **253**, 872-879 (1991).
5. O. Trott, A. J. Olson. *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading*, Journal of Computational Chemistry, **31**, 455-461 (2010).
6. Darrin M. York, Tai-Sung Lee. *Multi-scale quantum models for Biocatalysis: Modern Techniques and Applications*, Springer (2009).
7. RCSB PDB Protein Data Bank. *Crystal structure of Recombinant Human Acetylcholinesterase in the Apo state*, <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4EY4>.

### Liên hệ: Nguyễn Hữu Thọ

Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên

Đại học Quốc gia Hà Nội

Số 19, Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm Hà Nội

E-mail: thochemist@gmail.com; Điện thoại: 0912468576.