

VỀ TÍNH LINH ĐỘNG CỦA PHỐI TỬ VÀ CÁC AXIT AMIN VÙNG HOẠT ĐỘNG TRONG CÁC PHỨC AXYL VÀ MICHAELIS CỦA NITROXEFIN VÀ METIXILIN VỚI SAUPBP2A KHÁNG METIXILIN (MRSA)

Đặng Ứng Vận^{1,2}, Nguyễn Hòa My¹, Trương Nguyễn Thành³

¹Khoa Hóa, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Đại học Hòa Bình, Hà Nội

³Đại học Utah, Hoa Kỳ

Đến Tòa soạn 8-12-2010

Abstract

We have implemented 10ns molecular dynamics (MD) calculation for six Michaelis and acyl complexes of antibiotic methicillin (MC1) and nitrocefin (NC1) with Penicillin-binding protein 2a (PBP2a) of *Staphylococcus aureus* and for apo enzyme as well. The contrary known on the very stable covalent SauPBP2a- β -lactam complexes and the resistance of SauPBP2a has been explained by analyzing structure, dynamics of inhibitor and protein as well. The rearrangement of the helix $\alpha 2$ N-terminus and the strand $\beta 3$ in active region is not only cause of the resistance. RMSF analyse shown that the flexibility of helix $\alpha 2$ N-terminus, the flexibility of the ligand molecule and Ser403 support significantly the acylation which is more convenience in NC1-complex than in MC1 one. The dynamics of hot-spot residues and the active site adjacent cleft are of particular interest, as they should be suggested to provide additional opportunities for drug discovery that could potentially mitigate the effects of drug resistance.

1. MỞ ĐẦU

Nghiên cứu cơ chế kháng thuốc của *Staphylococcus aureus*, một nguyên nhân chung của các bệnh nhiễm khuẩn có tầm quan trọng đặc biệt trong việc phát triển các thế hệ thuốc kháng sinh mới góp phần ngăn chặn căn bệnh nguy hiểm này. Trong công trình trước [1], chúng tôi đã thông báo về sự phát hiện ra khe (cleft) β_3Z bên cạnh tâm hoạt động Ser403 có vai trò rất đáng quan tâm trong việc nghiên cứu cơ chế kháng thuốc của MRSA. Về nguyên tắc, sự axyl hóa bao gồm giai đoạn chuyển β -lactam vào vị trí axyl hóa, nghĩa là đưa nhóm keton của vòng lactam lại gần Ser403, tạo phức Michaelis. Ở đây có sự thay đổi cấu hình vùng hoạt động cũng như khe β_3Z bên cạnh nó bởi vì cấu trúc enzym apo không thuận lợi cho việc di chuyển này [1]. Tiếp theo là sự tạo thành phức trung gian axyl-PBP2a. Một lần nữa cấu hình không gian của vùng hoạt động lại thay đổi do quá trình tạo liên kết C-O giữa C của nhóm keton vòng lactam với O γ của Ser403 và cắt đứt liên kết C-N vòng lactam. Như vậy, nếu phối tử và các axit amin trong vùng tâm hoạt động càng linh động (flexible) thì khả năng axyl hóa càng lớn. Phân tích chi tiết về sự khác biệt cấu trúc và động lực được xác định bằng phương pháp động lực phân tử (molecular dynamics - MD) giữa các phức Michaelis và phức axyl (liên kết cộng

hóa trị) sẽ cho cái nhìn mới về cơ chế kháng β -lactam và sẽ có ích cho việc thiết kế những kháng sinh hiệu quả hơn. Hai chất thụ động β -lactam đặc trưng là metixilin (MC1) và nitrocefin (NC1) có hoạt tính khác nhau đối với MRSA đã được lựa chọn để tính toán.

2. PHƯƠNG PHÁP TÍNH

Mảnh cắt PBP2a** từ SauPBP2a bao gồm các axit amin từ 327 đến 668 được sử dụng thay cho SauPBP2a* đầy đủ để giảm bớt thời gian tính. Việc cắt giảm này không ảnh hưởng đến việc nghiên cứu động học và cấu trúc của sự gắn kết β -lactam lên SauPBP2a [1]. Có sự khác biệt trong việc xác lập các tệp topo cho phức axyl và phức Michaelis. Vì thế, đôi khi phải thực hiện bằng tay. Nói chung quá trình chuẩn bị tính MD bao gồm 3 bước:

1. Chuẩn bị phối tử cho các phức Michaelis. Cấu trúc của các phối tử MC1 và NC1 được tối ưu hóa sử dụng lý thuyết phiếm hàm mật độ B3LYP với bộ hàm cơ sở 6-31G* thực hiện trên phần mềm GAUSSIAN [2]. Tệp topo của các phối tử được xác lập trực tuyến trên trang WEB của phần mềm PRODRG [3].

2. Chuẩn bị protein. Cấu trúc tia X của PBP2a (PDB ID = 1vqq) và các phức của nó với metixilin (1mwu) và nitrocefin (1mws) được lấy từ Ngân hàng

Dữ liệu Protein (PDB). Việc bổ sung các axit amin còn thiếu được thực trên phần mềm Modeller [4]. Các nguyên tử hydrogen được bổ sung và tệp topo của protein đối được xác định bằng modun pdb2gmx của phần mềm GROMACS [5]. Có 2 loại cấu trúc protein được dùng làm cấu hình ban đầu cho các phức Michaelis: i) cấu trúc apo của protein (1vqq); ii) cấu trúc apo hydrat hóa trung bình động lực phân tử ở 298 K [1] có cấu trúc i) là cấu hình ban đầu và iii) cấu trúc protein trong các tinh thể phức tương ứng (1mwu và 1mws).

3. Chuẩn bị các phức Michaelis và axyl. Các cấu trúc tinh thể 1mwu và 1mws được sử dụng làm cấu trúc ban đầu cho các tính toán MD của phức PBP2a** với lần lượt là metixilin và nitroxefin. Cấu trúc ban đầu của các phức Michaelis khe β_3Z đóng và mở được tạo nên bởi phần mềm AutoDock [6] gắn kết các phối tử lên lần lượt các cấu trúc ii) và iii) của protein đã trình bày ở trên. Với mỗi cấu trúc ban đầu, sau khi hydrat hóa một số phân tử nước được thay thế bằng ion Na^+ để đảm bảo hệ đạt được cân bằng điện tích. Sau đó hệ được tối ưu năng lượng bằng thuật toán đường dốc nhất (steepest decent) trong phần mềm GROMACS. Trường lực GROMOS96.1 được sử dụng trong tất cả các tính toán MD.

Tính toán động lực phân tử được thực hiện trên phần mềm GROMACS theo một quy trình 2 bước [7]: i) đốt nóng hệ lên 298K sử dụng tổ hợp hai tính toán mô phỏng trong hai tập hợp chính tắc: thể tích không đổi và sau đó áp suất không đổi.; ii) tính toán ở thể tích cân bằng không đổi trong 10ns để thu thập dữ liệu. Một số tham số quan trọng là: hộp mô phỏng có kích thước sao cho cách nguyên tử gần

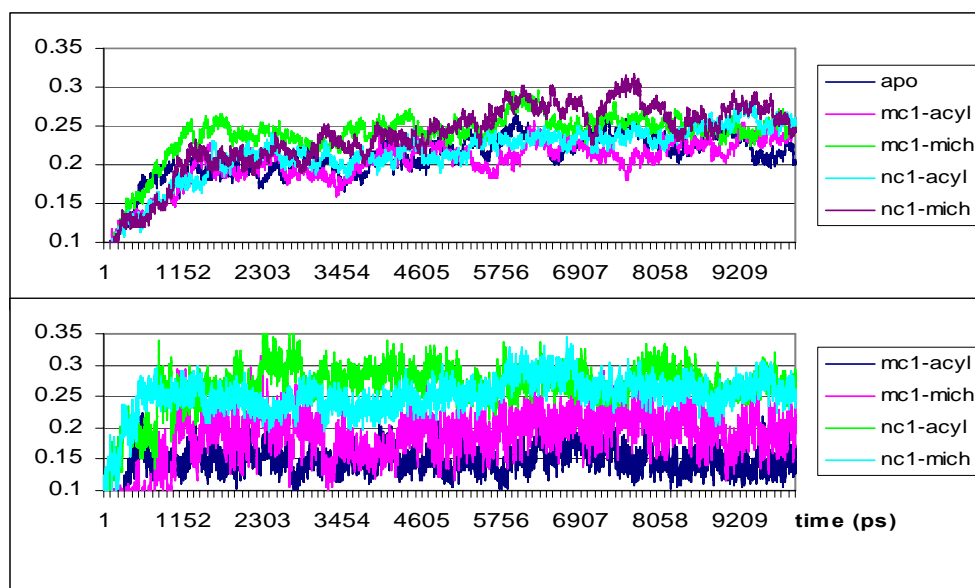
mép hộp nhất là 10Å (1 nm). Tương tác xa được cắt ở khoảng cách 10Å. Mô hình tương tác tĩnh điện được xử lý bằng phương pháp PME (particle mesh Ewald). Động lực Langevin được sử dụng để kiểm soát nhiệt độ. Các bước mô phỏng cách nhau 2fs; tổng số 20ps dành cho mô phỏng thể tích không đổi và 100ps cho áp suất không đổi. LINCS được sử dụng để cường bức các liên kết hydro với các tham số xác định. Sau đó hệ được duy trì ở thể tích không đổi và 298K cho đến khi RMSD ổn định. Thời gian tổng cộng là 10ns cho mỗi hệ được tính toán. Quỹ đạo chuyển động nguyên tử và năng lượng được ghi lại sau mỗi 0.4 ps. Phân tích RMSD, RMSF, khoảng cách, góc vận ... được thực hiện bằng các modun của GROMACS.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

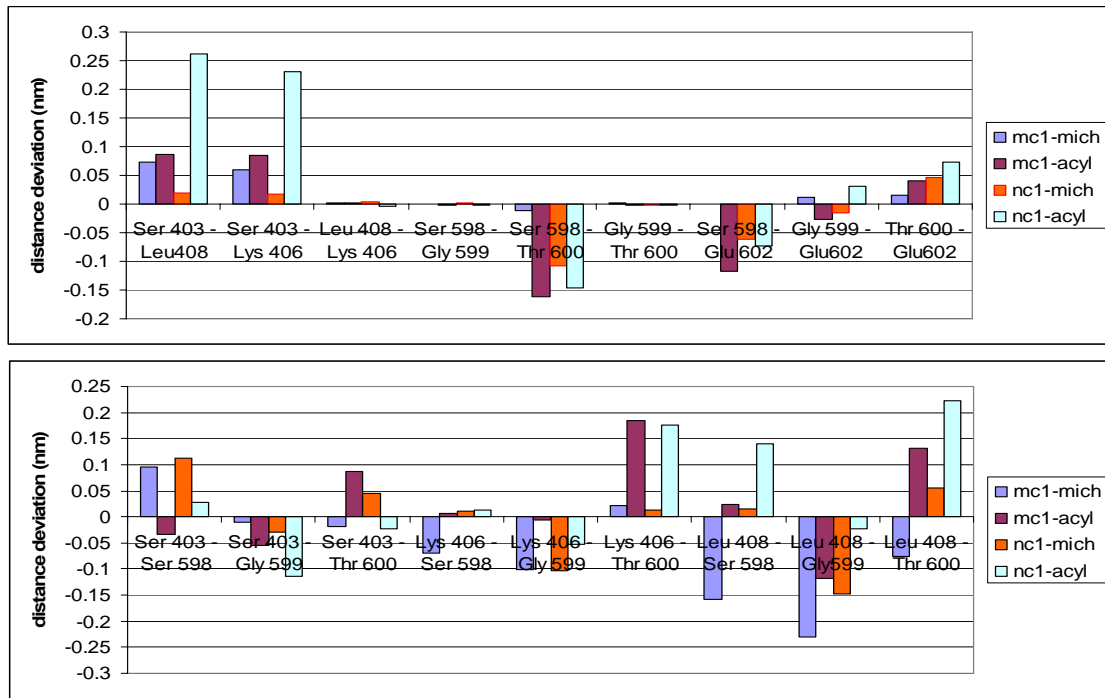
RMSD của phối tử sau khi khớp bình phương nhỏ nhất với khung protein của cấu trúc ban đầu được trình bày ở hình 1. Dễ thấy rằng RMSD của cả hai phức axyl và Michaelis của MC1 đều thấp hơn các giá trị tương ứng của NC1 và RMSD của phức axyl của cả hai MC1 và NC1 đều thấp hơn các giá trị của phức Michaelis tương ứng. Điều đó có nghĩa rằng, NC1 trong các phức với PBP2a* linh động hơn so với MC1 và phối tử trong các phức Michaelis linh động hơn so với trong các phức axyl.

Sự sắp xếp lại vùng tâm hoạt động

Theo giả thiết của Lim và Strynadka [8], để khảo sát sự sắp xếp lại vùng tâm hoạt động, nghĩa là các



Hình 1: RMSD của khung protein (trên) và phối tử (dưới) nhận được bằng các khớp bình phương tối thiểu với khung protein ban đầu trong phức axyl, phức Michaelis khe β_3Z mở và cấu trúc apo



Hình 2: Sự sai lệch của khoảng cách C α trung bình (nm) của các axit amin trong xoắn α_2 đầu N (3 nhóm đồ thị đầu tiên bên trái hình trên) và nếp gấp β_3 (6 nhóm đồ thị kế tiếp tính từ trái qua của hình trên) và giữa xoắn α_2 đầu N và nếp gấp β_3 (hình dưới) trong phức axyl và phức Michaelis khe β_3Z mở so với giá trị tương ứng trong cấu trúc apo

axit amin “nóng” trong nếp gấp β_3 và xoắn α_2 đầu N, chúng tôi đã tính khoảng cách trung bình C α giữa các axit amin chủ chốt bao gồm: Ser403, Lys406 và Leu408 trong xoắn α_2 đầu N cũng như là Ser598, Gly599, Thr600 và Glu602 trong nếp gấp β_3 . Kết quả tính toán đối với các phức Michaelis và phức axyl được trình bày trên hình 2 so sánh với cấu trúc apo. Có thể thấy rằng không có sự sai lệch đáng kể (< 1,0 Å) của khoảng cách C α trong xoắn α_2 đầu N giữa cấu trúc apo và phức Michaelis khe β_3Z mở của MC1, giữa cấu trúc apo và phức axyl của MC1 cũng như giữa cấu trúc apo và phức Michaelis khe β_3Z mở của NC1. Trong khi đó, có một sự sai lệch đáng kể được tìm thấy trong phức axyl NC1 mà ở đó khoảng cách C α giữa Ser403 và Leu408 tăng 2,62Å và giữa Ser403 và Lys406 tăng 2,30Å so với những khoảng cách tương ứng trong cấu trúc apo. Trong nếp gấp β_3 , ngoại trừ trường hợp phức Michaelis khe β_3Z mở của MC1 có một sự khác biệt đáng kể của khoảng cách C α giữa Ser598 và Thr600. Cụ thể các giá trị khoảng cách này với các phức axyl của MC1, phức Michaelis khe β_3Z mở của NC1 và phức axyl của NC1 lần lượt là: 1,62, 1,08 và 1,46. Điều cần phải nhấn mạnh là sự axyl hóa để tạo phức axyl của NC1 bao gồm sự tạo phức Michaelis đòi hỏi sự sắp xếp lại xoắn α_2 đầu N và nếp gấp β_3 nhiều hơn so với việc tạo phức axyl của MC1. Bởi vì nitroxefin là chất thụ động hiệu quả hơn so với metixilin nên hoàn toàn có thể khẳng định rằng sự sắp xếp lại xoắn α_2 đầu N trong vùng hoạt động không phải là lý do

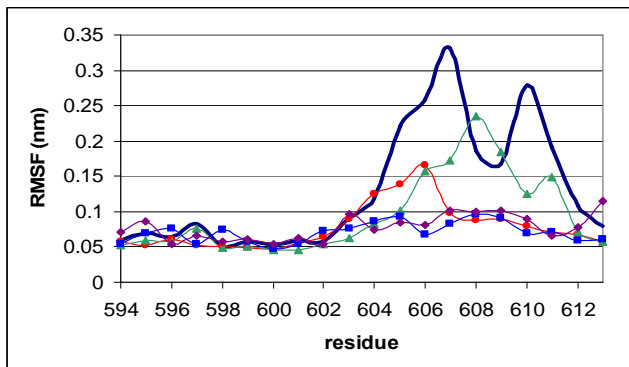
duy nhất gây nên sự kháng thuốc của PBP2a*.

Tính linh động của các axit amin trong vùng tâm hoạt động và khe lân cận β_3Z

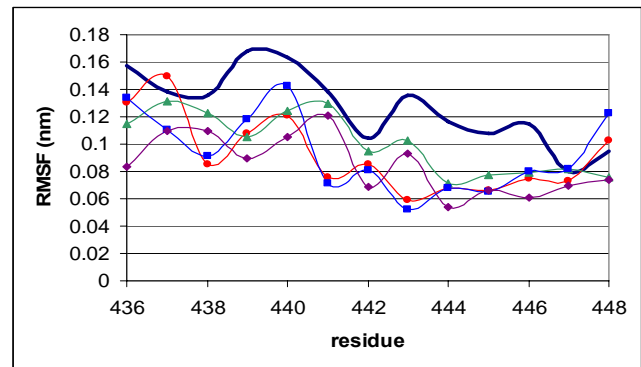
Để xác định những đặc tính động lực của các axit amin trong hai hệ phức axyl và Michaelis của MC1 và NC1, chúng tôi đã tiến hành phân tích sự thăng giáng của RMSD xung quanh giá trị trung bình (root-mean-square fluctuation - RMSF). Kết quả được trình bày trên hình 3. Có thể thấy rằng sự thăng giáng lớn nhất là ở trong vùng của các axit amin Lys606-Glu609 thuộc cuộn Y (bao gồm các axit amin 602-612) kế tiếp với nếp gấp β_3 và là những axit amin còn thiếu trong cấu trúc tinh thể của phức axyl [8]. Như vậy, các axit amin này không ảnh hưởng đáng kể đến biến thiên năng lượng sắp xếp lại vùng tâm hoạt động khi axyl hóa. Tuy vậy, các axit amin này trong tất cả các phức mà chúng tôi khảo sát đều thể hiện tính linh động kém hơn trong cấu trúc apo. Trong trường hợp MC1, phức axyl có các RMSF thấp hơn so với phức Michaelis, trong khi đó có một sự sai lệch không đáng kể giữa các phức axyl và Michaelis của NC1. Bên cạnh đó, các phức NC1 có RMSF thấp hơn nhiều so với các giá trị tương ứng của MC1 (Hình 3a). Điều thú vị là giá trị RMSF của các axit amin trong nếp gấp β_3 (594-603) không thay đổi rõ rệt giữa các phức và cấu trúc apo (hình 3a). Một nhóm khác có sự sai lệch rõ rệt giữa RMSF của các axit amin trong cấu trúc apo và trong phức là cuộn Z (440-447). Sự tồn tại của hai cả

hai phối tử đều làm giảm giá trị RMSF của các axit amin 438, 439, 442, 443, 444 and 445 (hình 3b). Điều này chỉ ra sự ổn định đáng kể của cuộn Z khi protein liên kết với NC1 và MC1 cả trong phức axyl và phức Michaelis. Đặc biệt là, có sự tăng giá trị RMSF của một số axit amin của xoắn $\alpha 2$ đầu N trong phức của NC1. Sự gia tăng lớn nhất là ở Gln405 của phức NC1-axyl và Pro401 của phức NC1- Michaelis, trong khi đó, không có sự khác biệt rõ rệt giữa các giá trị RMSF của phức MC1 và cấu trúc apo (hình 3c). Sự thăng giáng vị trí lớn hơn của

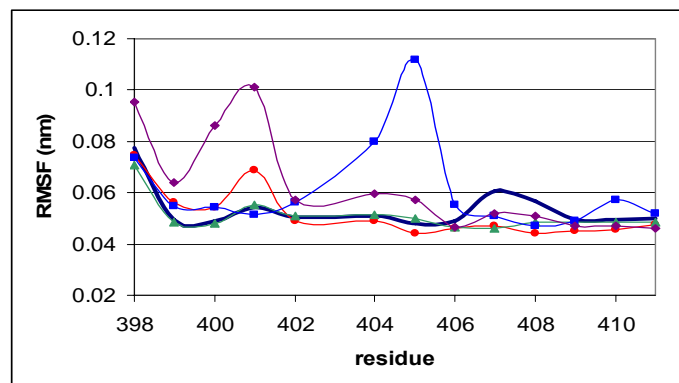
các axit amin trong vùng xoắn $\alpha 2$ đầu N và sự giảm sâu hơn của RMSF của các axit amin trong cuộn Y của phức NC1 so với phức MC1 có thể góp phần vào sự tăng hiệu quả ức chế PBP2a* của nitrocefim so với metixilin. Những axit amin của xoắn $\alpha 2$ đầu N của phức NC1 càng linh động hơn (RMSF càng lớn) so với các phức MC1 thì việc axyl hóa PBP2a của NC1 càng thuận lợi hơn so với MC1. Ngoài ra những axit amin cuộn Y của phức NC1 có RMSF rất thấp hơn nhiều so với phức MC1 chứng tỏ phức NC1 là bền hơn so với phức MC1.



(a)



(b)



(c)

Hình 3: Phân tích RMSF. RMSF trung bình/axit amin trong cấu trúc apo (đường liền), trong phức axyl của PBP2a** với MC1 (hình tròn) và NC1 (hình vuông) và trong phức Michaelis khe β_3Z mở của PBP2a** với MC1 (hình tam giác) và NC1 (hình thoi). (a) nếp gấp β_3 và cuộn Y; (b) cuộn Z; (c) xoắn $\alpha 2$ đầu N

Sự thay đổi cấu trúc β -lactam và tính linh động của phối tử trong các phức.

Thực tế là phản ứng axyl hóa từ phức Michaelis thành phức axyl trung gian dẫn đến thay đổi tất yếu của cấu trúc vùng hoạt động và vùng hoạt động cũng như các phối tử càng linh động thì phản ứng axyl hóa càng dễ xảy ra. Để tiếp tục làm rõ vai trò của tính linh động của các nhóm nguyên tử trong khả năng thụ động PBP2a* của các phối tử, chúng tôi cũng đã phân tích RMSF và vectơ riêng của phối tử và axit amin Ser403 trong các phức Michaelis khe β_3Z mở của PBP2a** với metixilin và nitrocefim (bảng 1). Kết quả cho thấy RMSF và véc tơ riêng

của cả nitrocefim và Ser403 trong phức nitrocefim đều lớn hơn rõ ràng so với các giá trị tương ứng của phức metixilin. Điều đó có nghĩa là, trong cấu trúc phức Michaelis khe β_3Z mở phân tử nitrocefim linh động hơn so với metixilin và Ser403 trong phức với nitrocefim cũng linh động hơn so với trong phức của metixilin. Vì thế, bên cạnh xoắn $\alpha 2$ đầu N như đã trình bày ở trên, việc các phân tử phối tử cũng như Ser403 linh động hơn đã làm cho phản ứng axyl hóa trở nên thuận tiện hơn nhiều so với metixilin. Như thế, động lực của các axit amin “nóng” cần đặc biệt quan tâm bởi vì chúng cung cấp cơ hội bổ sung cho việc thiết kế các thuốc mới giảm thiểu những tiềm ẩn của những yếu tố kháng thuốc trong chính ngày

các chất thụ động này.

*Bảng 1: RMSF (nm) và véctơ riêng (nm²) của phối tử và Ser403 trong các phức Michaelis khe β_3Z mở của PBP2a** với metixilin và nitroxefin*

Ser403				
Phức	RMSF, nm	Véctơ riêng, nm ²		
Metixilin	0,0132	6,41e-05	5,84e-05	1,38e-05
Nitroxefin	0,0254	8,78e-04	2,70e-04	5,64e-05
Phối tử				
Metixilin	0,0415	5,30e-04	3,82e-04	2,64e-04
Nitroxefin	0,0697	8,22e-04	4,41e-04	3,03e-04

4. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tiến hành tính toán động lực phân tử cho hệ apo và 4 hệ phức của metixilin và nitroxefin với PBP2a** tới 10 ns. Nghịch lý giữa tính bền của phức axyl và sự kháng thuốc của PBP2a đã được giải thích bằng các tính toán MD dựa trên việc phân tích sự biến đổi cấu trúc và động lực của chất thụ động và protein. Bởi vì sự thay đổi cấu hình vùng tâm hoạt động của phức nitroxefin lớn hơn hẳn so với phức metixilin trong khi nitroxefin lại có khả năng ức chế MRSA lớn hơn hẳn so với metixilin nên sự sắp xếp lại xoắn α_2 đầu N và nếp gấp β_3 trong vùng hoạt động không phải là lý do duy nhất của việc kháng thuốc. Một lý do khác chính là tính linh động của phân tử chất thụ động cũng như của một số axit amin vùng hoạt động đã tăng cường khả năng ức chế và ngược lại, tính linh động của các phần tử này giảm sẽ làm cho tính kháng chất thụ động tăng lên. Đây là điểm mới do chúng tôi đề xuất trong phương hướng tìm kiếm các chất kháng sinh mới.

Các tác giả cảm ơn A. W. Schuettelkopf and D. M. F. van Aalten đã duy trì trang web http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg_beta cho tính trực tuyến topo của các

phối tử dùng trong nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyen Hoa My, Dang Ung Van, Le Kim Long, Trung Nguyen Thanh. Vietnam Journal of Chemistry, Vol. 48(4B), 532 - 537 (2010).
2. M. J. Frisch, et al. Gaussian 03 ReVision C.02 ed.; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT (2004).
3. A. W. Schuettelkopf, van Aalten D. http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg_beta.
4. N. Eswar, M. A. Marti-Renom, B. Webb, M. S. Madhusudhan, D. Eramian, M. Shen, U. Pieper, A. Sali. Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. Current Protocols in Bioinformatics, John Wiley & Sons, Inc., Supplement 15, 5.6.1-5.6.30 (2006).
5. Hess, et al. J. Chem. Theory Comput., 4, 435 - 447 (2008).
6. S. F. Sousa, P. A. Fernandes, M. J. Ramos. Proteins., 65, 15 - 26 (2006).
7. http://www.dillgroup.ucsf.edu/group/wiki/index.php/Free_Energy_Tutorial
8. D. Lim and N. C. J. Strynadka. Nature Struct. Bio., 9, 870 - 876 (2002).

Liên hệ: Nguyễn Hòa My

Khoa Hóa học

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

19 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, Hà Nội.