

VỀ SỰ TỒN TẠI CỦA KHE HẸP HOẠT ĐỘNG GẦN TÂM SER403 CỦA SAUPBP2A KHÁNG METIXILIN (MRSA)

Đặng Ứng Vận^{1,2}, Nguyễn Hòa Mi²

¹Khoa Hóa Trường Đại học Khoa học Tự nhiên

²Trường Đại học Hòa Bình

Đến Tòa soạn 8-12-2010

Abstract

By comparing the crystal structure of apo enzyme PBP2a* and its acyl complexes with methicillin and nitrocefin we exploit an active site adjacent cleft which has closed and open situation. The existence of a two conformation adjacent cleft of the active site should be paid attention in resistance mechanism. The cleft closed conformation detected in SauPBP2a apoenzyme structure prevents β -lactam far from active site. The cleft open conformation observed in SauPBP2a structure of acyl complexes allows β -lactam molecule pass over approaching the position suitable for nucleophilic attack. Using a combination of AutoDock docking and GROMACS molecular dynamics software we confirm the cleft existence, its two situation and the ability of conformation change from closed to open situation which appropriate for acylation process.

1. MỞ ĐẦU

Staphylococcus aureus - nguyên nhân chung của bệnh nhiễm khuẩn tụ cầu – nhạy với penixilin, một loại β -lactam phổ dụng trước những năm 1940. Việc kháng penixilin thế hệ 1 hình thành từ việc lan truyền những chủng có chứa men β -lactamase loại A. Đáp ứng với những thách thức của β -lactamase, thế hệ thứ hai của penixilin trong đó có metixilin đã được phát hiện. Tuy vậy, khoảng năm 1961 một chủng của *S. aureus* được hình thành có khả năng kháng cả metixilin và các β -lactam khác. Chủng này sau đó được gọi là *S. aureus* [1] kháng metixilin (MRSA). Việc gần đây hình thành các biến thể của MRSA kháng với các kháng sinh glycopeptid như là vancomycin đã mở ra một giai đoạn mới trong tiến hóa của sinh vật này. Ngày nay MRSA gây nên một trong những bệnh nhiễm khuẩn nguy hiểm nhất. Việc tiến hóa theo hướng kháng lại các thuốc kháng sinh là điều rất đáng quan tâm [2]. Nhu cầu có những kháng sinh mới để điều trị căn bệnh này là rất quan trọng [3]. Hiểu biết về cơ chế kháng thuốc của enzym này, do đó, thu hút được sự quan tâm rộng rãi.

Đã có những tổng quan trình bày về cơ chế kháng β -lactam [4, 5]. Có 3 cơ chế được giả định: 1) sản sinh ra men β -lactamase có khả năng xúc tác thủy phân β -lactam; 2) sử dụng các men transpeptidase màng tế bào nhạy với β -lactam (PBPs); và 3) trực xuất các phân tử β -lactam khỏi các tế bào gram âm bằng con đường bơm thoát. Theo cơ chế thứ hai, việc kháng thuốc kháng sinh là

do một enzym có tên là PBP2a (penicillin-binding protein), một chủng mới được phát hiện khác hẳn với các chủng PBP khác do *S. aureus* tạo ra [6]. Enzym này xúc tác cho việc tạo thành màng tế bào (của khuẩn) và quá trình này bị ức chế bởi β -lactam, làm yếu vi khuẩn và có thể giết chết nó [7]. Acyl hóa - chìa khóa để thụ động PBPs bởi β -lactam – có thể bao gồm bước tạo nhanh phức không cộng hóa trị - Michaelis rồi sau đó là việc tấn công ái nhân bởi tâm hoạt động Ser403 lên vòng β -lactam cho ra sản phẩm trung gian phức cộng hóa trị acyl-PBP [8]. Thêm nữa do phức này rất bền nên quá trình acyl hóa PBP bởi β -lactam là một chiều (single-turnover) [9]. Vậy mà, với những β -lactam bị kháng những sản phẩm phức trung gian này không tồn tại *in vivo* [1] nên những yếu tố cơ bản của tính kháng thuốc mà chúng ta quan sát được là do ái lực thấp của β -lactam đối với các enzym PBP2a (hiệu ứng k_d – phức Michaelis) [10,11] và tốc độ acyl hóa chậm (hiệu ứng k_2). Bằng cách phân tích cấu trúc tinh thể các phức acyl và cấu trúc apo, Lim và Strynadka [12] đã giả thiết một cơ chế kháng thuốc có thể chấp nhận được, trong đó sự thay đổi cấu trúc tâm hoạt động trong quá trình chuyển từ phức Michaelis sang phức trung gian acyl-PBP đòi hỏi một năng lượng lớn để đưa β -lactam vào vị trí acyl hóa. Quá trình này đòi hỏi một sự vận nếp gấp β_3 (gồm các axit amin 594-603) với một sự thay đổi thích hợp của xoắn α_2 đầu N (bao gồm các axit amin 402-408) với Ser403 cho tấn công ái nhân. Tuy vậy, những tính toán của chúng tôi trình bày dưới đây chỉ ra rằng bên cạnh tâm hoạt động còn có mặt một rãnh (cleft) hoạt

động giữa một bên là nếp gấp $\beta 3$ và một bên là nhóm các axit amin 440-447 được gọi là cuộn Z đóng vai trò quan trọng trong việc tạo thành phức Michaelis liên quan đến chất trung gian acyl-PBP.

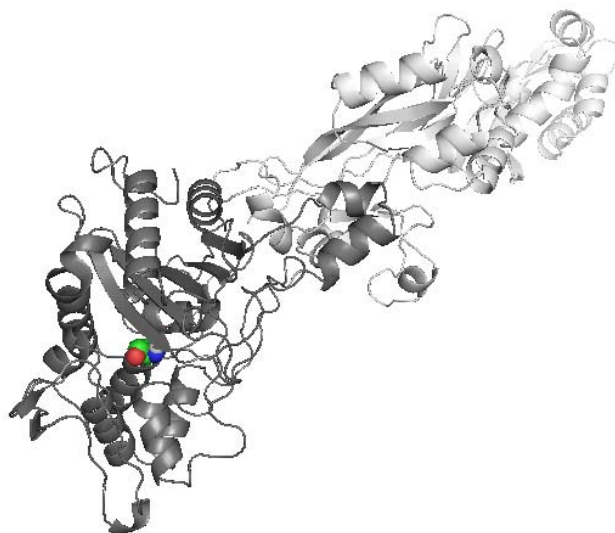
2. PHƯƠNG PHÁP TÍNH

2.1. Chuẩn bị cấu trúc phối tử và protein cho việc tính toán mô phỏng

Cấu trúc tinh thể của phân mảnh PBP2a từ *S. aureus* (gọi là SauPBP2a*) được xác định bởi Lim và Strynadka (ký hiệu trong Ngân hàng dữ liệu protein - Protein Data Bank - PDB là 1VQQ) được chỉ ra trong hình 1 có thể chia thành hai mảnh. Mảnh thứ nhất từ axit amin 27 đến 300 và mảnh thứ hai từ axit amin 301 đến 668. Tâm gắn kết bao gồm nếp gấp $\beta 3$ và xoắn $\alpha 2$ đầu N định vị ở cực thứ hai và nằm xa các nguyên tử của mảnh thứ nhất hơn 20 Å. Chúng tôi minh chứng rằng tác động của các nguyên tử của mảnh thứ nhất đối với động học của tâm gắn

kết là không đáng kể.

Để định lượng hiệu ứng của việc bỏ qua mảnh thứ hai đến động học của tâm gắn kết nhằm rút ngắn thời gian tính, chúng tôi đã thực hiện những tính toán mô phỏng động lực phân tử (MD) trên phần mềm GROMACS với hệ phức acyl metixilin-SauPBP2a*. Cấu trúc tinh thể phức acyl của metixilin với PBP2a* (ký hiệu trong PDB là 1MWU) được sử dụng làm cấu trúc ban đầu. Quy trình tính được trình bày chi tiết trong tài liệu của GROMACS. Thời gian ghi cấu hình tức thời của hệ là 1ns. Hình 2 cho thấy độ sai lệch bình phương trung bình (root mean square deviation - RMSD) của metixilin khi khớp với toàn bộ tọa độ các nguyên tử ở cấu hình ban đầu của SauPBP2a* đầy đủ không khác đáng kể so với giá trị thu được khi khớp với các nguyên tử ở cấu hình ban đầu của chỉ mảnh thứ hai của SauPBP2a*. Điều này chứng tỏ cấu trúc protein đã cắt bỏ mảnh thứ nhất (ký hiệu SauPBP2a**) là đủ cho các nghiên cứu về động học của sự gắn kết phối tử tại tâm gắn kết.



Hình 1: Cấu hình của SauPBP2a* (vùng màu đậm và nhạt), SaPBP2a** (màu đậm) và Ser 403 (các quả cầu)

Ngoài việc cắt bỏ phân mảnh thứ nhất, có 3 kiểu protein được dùng cho các tính dưới đây: i) cấu trúc tinh thể apo (protein không phối tử) có ký hiệu 1vqq trong Ngân hàng dữ liệu protein (PDB); ii) cấu trúc apo hydrat hóa trung bình tính được từ kết quả mô phỏng động lực phân tử ở 298K và iii) cấu trúc protein trong các tinh thể phức acyl của metixilin và nitroxfen có ký hiệu PDB tương ứng là 1MWU và 1MWS. Cấu trúc tinh thể lấy từ PDB được bổ sung các axit amin còn thiếu bằng phần mềm Modeller. Các nguyên tử hydro được bổ sung và các tệp topo của protein nhận được từ modun pdb2gmx của phần mềm GROMACS.

Cấu trúc của các phối tử metixilin (MC1) và

nitroxfen (NC1) được tối ưu đầy đủ bằng phương pháp phiếm hàm mật độ với gần đúng B3LYP sử dụng bộ cơ sở 6-31G* thực hiện trên phần mềm GAUSSIAN. Thông tin về topo phân tử nhận được bằng phần mềm trực tuyến PRODRG.

2.2. Phần mềm gắn kết AutoDock và động lực phân tử GROMACS

Có nhiều phần mềm có thể dùng để gắn kết phối tử lên protein, ví dụ như QUANTUM, GLIDE hoặc AutoDock. Riêng AutoDock với độ tin cậy cao lại là phần mềm miễn phí nên được trích dẫn nhiều nhất trong các công trình nghiên cứu về phức phối tử-

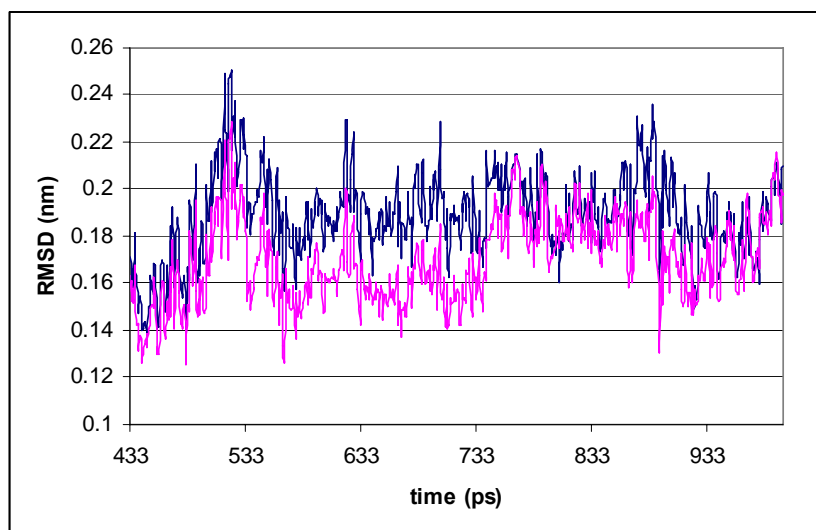
protein. Trong công trình này chúng tôi cũng sử dụng AutoDock để xác lập cấu trúc phức Michaelis của các hệ nghiên cứu. AutoDock có 2 kỹ thuật tính toán: kỹ thuật axit amin cứng (rigid) và kỹ thuật axit amin linh động (flexible). Trong kỹ thuật axit amin cứng toàn bộ tọa độ nguyên tử các axit amin của protein được giữ nguyên không đổi. Trong kỹ thuật axit amin linh động, một số axit amin xác định được phép thay đổi tọa độ nguyên tử do kết quả của việc thay đổi các góc nhị diện tương ứng mà không làm thay đổi khung (backbone) protein. AutoDock cho ra nhiều cấu hình gắn kết khác nhau (thông thường là 10) của phối tử hoặc của phối tử và các axit amin linh động (với kỹ thuật axit amin linh động) và được xếp theo thứ tự tăng dần của năng lượng tự do gắn kết Ebind.

Cũng có rất nhiều phần mềm mô phỏng động lực phân tử. GROMACS là phần mềm mã nguồn mở, miễn phí, có hiệu năng tính toán và độ tin cậy cao. Trong bài báo này chúng tôi chỉ sử dụng các modul thiết lập hộp mô phỏng *editconf*, hydrat hóa *genbox*, bổ sung ion *genion* và tối ưu cấu hình theo thuật toán đường dốc nhất (steepest decent).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự khác biệt trong cấu trúc tinh thể của protein apo và của các phức acyl.

Khi so sánh khoảng cách giữa các nguyên tử của các axit amin trong cấu trúc tinh thể chúng tôi phát hiện ra một khe (cleft) lân cận với Ser403 tạo nên bởi nếp gấp β_3 và cuộn Z (bao gồm các axit amin 440-447) được gọi là khe β_3Z có thể đóng vai trò trong cơ chế kháng thuốc bởi vì có sự khác biệt khá rõ nét giữa cấu hình khe trong protein apo và trong phức acyl. Khoảng cách R_{O-O} giữa Thr444- $O_{\gamma 1}$ của cuộn Z và Glu602-Oe1 của nếp gấp β_3 giảm đi đáng kể từ phức acyl MC1 và NC1 đến protein apo. Hoàn toàn có lý khi giả thiết rằng có 2 cấu dạng của khe tùy thuộc vào khoảng cách R_{O-O} . Cấu dạng thứ nhất có R_{O-O} lớn tạo nên trạng thái mở của khe quan sát được trong các phức acyl. Cấu dạng thứ hai có R_{O-O} nhỏ tạo nên trạng thái đóng của khe quan sát được trong cấu trúc apo protein. Dễ dàng dự báo rằng, trạng thái đóng của khe sẽ ngăn cản phối tử lại gần tâm tấn công ái nhân Ser403. Trạng thái mở của khe sẽ cho phối tử đi qua và tiếp cận Ser403 (hình 3).

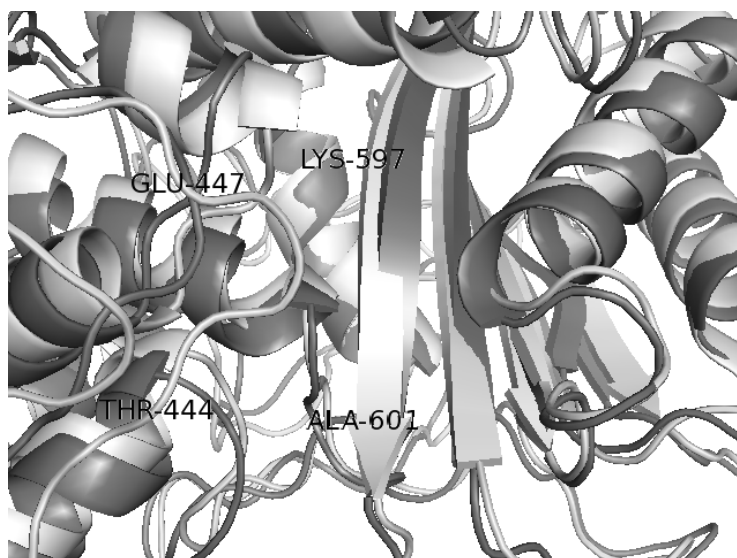


Hình 2: Minh họa về ảnh hưởng của hai nhánh của SauPBP2a* đến động học gắn kết phối tử. RMSD của metixilin trong phức acyl với SauPBP2a* nhận được khi khớp bình phương tối thiểu MC1 với cấu hình ban đầu của SauPBP2a* đầy đủ (màu nhạt) và với chỉ riêng phân mảnh SauPBP2a** (màu đậm)

Minh chứng cho sự hoạt động của khe β_3Z

Để khẳng định giả thiết về sự tồn tại của khe hoạt động β_3Z , chúng tôi đã thiết lập một quy trình tính toán phối hợp giữa gắn kết bằng AutoDock với cực tiểu năng lượng bằng GROMACS cho hai kiểu phức Michaelis của metixilin và nitroxefin: i) sử dụng cấu hình apo protein như là protein đối (target) có trạng thái đóng của khe β_3Z ; ii) sử dụng cấu hình protein trong các tinh thể phức acyl tương ứng (tức

là cấu hình protein trong các phức acyl có ký hiệu PDB lần lượt là 1MWU và 1MWS) có trạng thái mở của khe β_3Z . Kiểu phức thứ nhất được gọi là phức khe đóng. Kiểu phức thứ hai gọi là phức khe mở. Thoạt tiên AutoDock được sử dụng để gắn kết phối tử lên protein; sau đó các modul *genbox*, *genion* và thuật toán cực tiểu năng lượng đường dốc nhất của GROMACS được sử dụng để có được cấu hình tối ưu của phức.



Hình 3: Minh họa về các trạng thái của khe hoạt động. Trạng thái mở (màu sẫm) trong cấu trúc phức acyl của metixilin và trạng thái đóng (màu nhạt) trong cấu trúc apo protein. Các axit amin Glu447 và Thr444 thuộc về cuộn Z và các axit amin Lys597 và Ala601 thuộc về nếp gấp β_3

Bảng 1: Các dữ liệu của phức Michaelis tính toán trên phần mềm AutoDock và GROMACS

Phối tử	Trạng thái khe β_3Z	Năng lượng tự do gắn kết AutoDock (kcal/mol)	Khoảng cách $>C=O$ và O_γ AutoDock (nm)		Khoảng cách $>C=O$ và O_γ ở cực tiểu năng lượng GROMACS (nm)	
			R_{C-O}	R_{O-O}	R_{C-O}	R_{O-O}
MC1	mở	-6,00	0,32	0,24	0,35	0,24
MC1	đóng	-5,89	0,96	1,02	0,95	1,05
MC1	đóng với axit amin linh động	1,93e+05	0,42	0,32	0,48	0,43
NC1	mở	-8,10	0,55	0,50*	0,29	0,25
NC1	đóng	-7,79	1,41	1,37	1,24	1,34
NC1	đóng với axit amin linh động	1,77e+05	0,38	0,43	0,32	0,25

*Khoảng cách ngắn nhất giữa các nguyên tử phối tử và protein là 0,27 nm giữa Ser403- O_γ và nhóm cacboxyl $-COO$.

Bảng 1 trình bày dữ liệu của các phức Michaelis thu được khi sử dụng quy trình AutoDock-GROMACS bao gồm năng lượng tự do gắn kết AutoDock của cấu dạng có năng lượng tự do thấp nhất, khoảng cách R_{C-O} giữa $C=O$ vòng lactam và Ser403- O_γ trong cấu dạng này và giá trị của R_{C-O} sau khi tối ưu năng lượng GROMACS. Kết quả tính cho thấy cả hai phối tử đều bị ngăn cản bởi cấu hình khe β_3Z đóng ở một khoảng cách khá xa tâm hoạt động. Khoảng cách R_{C-O} giữa C của lactam $>C=O$ và O của Ser403- O_γ vào khoảng 10 - 14 Å (xem bảng 1). Khoảng cách này lớn hơn nhiều so với các phức Michaelis được tạo nên bởi việc gắn kết phối tử lên các protein tương ứng có cấu hình khe β_3Z mở mà ở đó khoảng cách R_{C-O} có giá trị khoảng 3 Å ngoại trừ

trường hợp nitroxefin tuy khoảng cách này khá lớn (5,5 Å) nhưng bù lại, có liên kết hydro được tạo thành giữa Ser403- O_γ và O của nhóm cacboxyl $-COO$ (2,7 Å). Năng lượng gắn kết của các phối tử trong các cấu hình khe đóng (-5,89 and -7,79 kcal.mol⁻¹ lần lượt với các phức MC1 và NC1) cao hơn một chút so với năng lượng gắn kết trong phức tương ứng có cấu hình khe mở (-6,00 and -8,10 kcal.mol⁻¹). Để mang các phối tử vào sâu tiếp cận với Ser403 trong cấu hình protein apo có khe β_3Z đóng chúng tôi thực hiện một quy trình sau đây:

Bước 1. Sử dụng cấu hình protein apo tinh thể làm cấu hình ban đầu. Hydrat hóa đầy đủ và bổ sung các ion thích hợp sao cho tổng điện tích của hệ = 0. Thực hiện tính toán MD trên phần mềm GROMACS

ở 298K trong 9ns sau đó xác định cấu trúc trung bình của protein trong 1ns tiếp theo.

Bước 2. Gắn kết phối tử lên cấu trúc protein trung bình thu được ở bước 1 bằng phần mềm AutoDock sử dụng kỹ thuật axit amin linh động. Cụ thể là lựa chọn 2 axit amin Thr600 và Glu602 của cuộn Z làm các axit amin linh động.

Bước 3. Hydrat hóa phức Michaelis thu được ở bước 2. Bổ sung các ion Na⁺ để cân bằng điện tích và thực hiện tối ưu năng lượng của hệ trên phần mềm GROMACS theo thuật toán đường dốc nhất không có bất kỳ một cưỡng bức nào.

Kết quả cũng được trình bày ở bảng 1. Dễ thấy rằng không có sự khác biệt lớn giữa khoảng cách R_{C-O} xác định được từ cấu hình gắn kết có năng lượng AutoDock thấp nhất và cấu hình năng lượng cực tiểu GROMACS với ngoại lệ là NC1 trong cấu hình phức khe β₃Z mở có khoảng cách ngắn nhất không phải là giữa Ser403-O_γ và lactam >C=O mà là giữa Ser403-O_γ và nguyên tử oxi của nhóm cacboxyl -COO (0,27 nm). Trong khi đó, AutoDock với một số axit amin linh động đã có thể mang phối tử lại gần Ser403-O_γ hơn trong cấu hình khe β₃Z đóng (R_{C-O} là 0,32 và 0,43 nm lần lượt với MC1 và NC1) so với cấu hình thu được khi chỉ dùng các axit amin cứng (rigid) (các khoảng cách tương ứng là 1,02 and 1,37 nm) và khá gần với các giá trị tương ứng trong phức có khe β₃Z mở. Mặt khác, trong trường hợp này – khi sử dụng một số axit amin linh động - năng lượng tự do gắn kết AutoDock của cấu dạng có năng lượng tự do thấp nhất trong cấu trúc khe β₃Z đóng rất cao (~ 1×10⁵ kcal/mol) so với năng lượng tự do gắn kết của cấu hình có khe mở hoặc cấu hình có khe đóng nhưng không dùng các axit amin linh động (do phối tử không thâm nhập được vào vùng tâm hoạt động) (khoảng 10 kcal/mol). Tuy vậy, thuật toán tối ưu đường dốc nhất năng lượng của GROMACS đã có thể giảm giá trị năng lượng tương ứng tới gần với giá trị của phức có khe mở mà không có sự khác biệt lớn về khoảng cách R_{C-O}. Về thực chất trạng thái mở của khe β₃Z có thể đạt tới được bằng thuật toán tối ưu năng lượng.

4. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã minh chứng được sự tồn tại của một khe hoạt động bên cạnh tâm hoạt động Ser403 của SauPBP2a* tạo nên bởi nếp gấp β₃ và cuộn Z. Khe này có hai trạng thái: đóng và mở có liên quan đến cơ chế thâm nhập của phối tử vào vùng tâm hoạt động chuẩn bị cho phản ứng acyl hóa. Quá trình

thâm nhập phối tử vào vùng tâm hoạt động cho phản ứng acyl hóa, như vậy có thể gồm 3 bước : i) tạo nên một phức Michaelis khe đóng giữa phối tử và cấu trúc protein apo mà ở đó phối tử nằm khá xa tâm hoạt động ii) sắp xếp lại khe β₃Z để mang phối tử lại gần tâm hoạt động Ser403 hơn iii) sắp xếp lại vùng tâm hoạt động để thu được một phức Michaelis ổn định và thích hợp cho quá trình acyl hóa. Về mặt năng lượng, giai đoạn i) và iii) là tự diễn biến với sự giảm năng lượng tự do trong khi đó giai đoạn ii) không thể xảy ra được nếu không được cung cấp một năng lượng cần thiết để mang phối tử lại gần Ser403 khi mà khe β₃Z đang đóng.

Các tác giả cảm ơn A. W. Schuettelkopf and D. M. F. van Aalten vì đã duy trì trang web http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg_beta dành cho việc xác định trực tuyến các tệp topo của phối tử dùng trong công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. M. G. Pinho, H. de Lencastre, A. Tomasz. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98 10886 - 10891 (2001).
2. M. I. Crisostomo, H. Westh, A. Tomasz, M. Chung, D. C. Oliveira, H. de Lencastre. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 9865 - 9870 (2001).
3. C. Fuda, M. Suvorov, S. B. Vakulenko, S. Mobashery. J. Biol. Chem., 279, 40802 - 40806 (2004).
4. J. F. Fisher, S. O. Meroueh, S. Mobashery. Chem. Rev., 105, 395 - 424 (2005).
5. M. S. Wilke, A. L. Lovering, C. J. Strynadka. Current Opinion in Microbiol., 8, 525 - 533 (2005).
6. K. Hiramatsu, L. Cui, M. Kuroda, T. Ito. Trends Microbiol., 9, 486 - 493 (2001).
7. D. Lim, Strynadka N. C. J. (2003) Science Highlights <http://nslsweb.nsls.bnl.gov/nsls/>
8. Ghuyssen, J.-M., Frere, J. M., Leyh-Bouille, Nguyen-Disteche, M., Coyette, J. Biochem. J., 235, 159 - 165 (1986).
9. B. Zerner, M. L. Bender. J. Am. Chem. Soc, 86, 3669 - 3674 (1964).
10. W. P. Lu, Y. Sun, M. D. Bauer, S. Paule, P. M. Koenig, W. G. Kraft. Biochemistry, 38, 6537 - 6546 (1999).
11. Graves-Woodward, K., Pratt, R. F. (1998) Biochem. J. 332, 755 - 761 (1998).
12. D. Lim, N. C. J. Strynadka. Nat. Struc. Bio., 9, 870 - 876 (2002).

Liên hệ: **Nguyễn Họa Mi**

Khoa Hóa học

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

19 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, Hà Nội.