

## NGHIÊN CỨU ĐỘNG LỰC PHÂN TỬ ẢNH HƯỞNG CỦA ĐỘT BIẾN E226Q ĐẾN TÍNH CHẤT CỦA PHỨC ENZYM CD38 VỚI cADPR

Đến Tòa soạn 21-8-2008

ĐẶNG ỨNG VẬN

Trường Đại học Hòa Bình, Hà Nội

### ABSTRACT

*Using GROMACS software a molecular dynamics simulation of the cADPR-CD38 (A) and cADPR-E226Q mutant (B) complexes has been implemented. The calculation results shown that there are no obvious differences between thermodynamic properties of these complexes. However, the variations of the molecular structure and kinetic properties as well could explain the essential elimination of catalytic activities by Glu226→S mutation. In A the cADPR could embed deep toward the bottom of the active site pocket making salt bridge with a catalytic residue Glu146, while there is no such a saltbridge in B. The averaged hydrogen bond number between cADPR and protein in B is higher than in A and on the contrary, the self-diffusion coefficient of cADPR in B is about two times smaller than in A.*

### I - MỞ ĐẦU

Trong công trình trước đây [1 - 3] chúng tôi đã trình bày những kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của đột biến gen đến hoạt tính xúc tác của enzym CD38 đối với các phản ứng đóng vòng và thủy phân bằng các phần mềm docking QUANTUM [4] và GLIDE [5]. Một trong những kết luận quan trọng được rút ra là liên kết hydrogen có tác động nhất định tới hoạt tính xúc tác của CD38 đối với phản ứng thủy phân cADPR<sup>1</sup> và đóng vòng ADPR. Tuy vậy, bản đồ liên kết hydrogen được quyết định bởi cấu trúc không gian của phức enzym-phối tử, trong khi thuật toán gắn kết (docking) [4, 5] không cung cấp cấu hình phức với độ tin cậy cần thiết và vì thế dễ dẫn đến những kết luận không được chuẩn xác. Nhằm bổ sung cho những kết quả nghiên cứu trước đây bằng phương pháp gắn kết

cũng như khẳng định lại những kết luận đã được công bố công trình này và các công trình tiếp theo sẽ trình bày những kết quả thu được khi sử dụng phương pháp động lực phân tử (molecular dynamics — MD) để nghiên cứu các hệ enzym CD38 - phối tử. Ưu điểm cơ bản của phương pháp MD đã được khẳng định về nguyên tắc là cách tiếp cận có công hiệu và triển vọng nhất để nghiên cứu tương tác và cấu hình phức enzym-phối tử [6, 7]. Phần II. trình bày về phương pháp tính và đối tượng nghiên cứu. Phần III, IV và V trình bày các kết quả tính toán động lực phân tử của hệ enzym CD38 tự nhiên (wild) -cADPR và thể đột biến E226Q — cADPR. Phần VI thảo luận về các kết quả thu được.

### II - PHƯƠNG PHÁP TÍNH VÀ ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Phương pháp động lực phân tử đã được trình bày trong nhiều công trình đã được công bố trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Trong số các phần mềm hiện hữu được sử dụng để mô phỏng

1 Những danh pháp viết tắt trong công trình này là: ADPR: adenosine-5-diphosphoribose, cADPR: cyclic adenosine diphosphate-ribose, NAD: nicotineamide-adenine-dinucleotide.

động lực phân tử hệ enzyme - phối tử phải kể đến TINKER [8] và GROMACS [9]. Với những ưu thế vượt trội, GROMACS được xem là nhanh, tiện lợi và được cung cấp miễn phí kể cả chương trình nguồn. Vì thế, những tính toán dưới đây đều được thực hiện trên phần mềm GROMACS mã nguồn mở phiên bản 3.3.3 phát hành năm 2005 với hệ điều hành LINUX UBUNTU. Ngoài ra, việc xây dựng các tệp INPUT tọa độ và topo của các phối tử được thực hiện trực tuyến trên phần mềm PRODRG [10]. VMD [11] cũng được sử dụng để hỗ trợ quá trình xử lý kết quả mô phỏng.

Enzym CD-38 của người là một enzym ngoại bào đa chức năng, chịu trách nhiệm trong việc xúc tác cho sự chuyển hóa NAD sang c-ADPR và từ cADPR sang ADPR [12]. Cả cADPR và ADPR đều là các phân tử tín hiệu về canxi, nó có thể giúp chuyển dịch canxi từ trong nội bào ra ngoài cũng như chuyển dịch ngược lại vào trong nội bào. Dữ liệu cấu trúc tinh thể của CD38 với ADPR có ID là 1yh3 và của thể đột biến E226Q với c-ADPR có ID là 2o3q nhận được từ Protein Data Bank.

Trước khi vào tính toán, dạng tự nhiên của CD38 và thể đột biến E226Q được tách ra khỏi tệp tọa độ phức và xử lý bằng SwissPDBViewer để bổ sung các phân tử còn thiếu trong các axit amin. Nhằm tránh những sai khác trong quá trình tính toán các nguyên tử hydro trong tệp .pdb nguồn đều được bỏ qua. GROMACS tự động bổ sung trong quá trình tính toán. Phối tử được đưa trực tiếp vào PRODRG để xác lập các tệp tọa độ .gro và tệp topo .top và .itp

Quá trình tính toán được thực hiện trong 22 bước. Chi tiết xem [13]. Những bước chủ yếu gồm: xác lập các tệp tọa độ và topo của enzym, xác lập hộp mô phỏng, solvát hoá toàn bộ hệ mô phỏng, cực tiểu hoá năng lượng, mô phỏng cưỡng bức tọa độ nguyên tử trong đó tọa độ của các nguyên tử của protein được hạn chế và các nguyên tử nước, cũng như phối tử được hồi phục (relax) xung quanh protein trong khoảng thời gian 20 ps (mỗi bước hồi phục 0.002 ps). Sau đó tính toán mô phỏng động lực phân tử đầy đủ được thực hiện trong 500.000 bước (1ns). Cuối cùng là việc phân tích các dữ liệu thu được.

### III - CÁC ĐẠI LƯỢNG NHIỆT ĐỘNG

Bảng 1 trình bày một số đại lượng nhiệt động trung bình của hệ CD38-cADPR và hệ E226Q-cADPR thu được sau 1000ps mô phỏng động lực phân tử. Dễ dàng thấy rằng việc đột biến E226Q không ảnh hưởng đến nhiệt dung và chỉ làm giảm thế năng của hệ một đại lượng khoảng 590 J/mol cỡ phương sai của thế năng, tăng chút ít RMSD cũng như độ thăng giáng của thế năng. Sự khác biệt về các lực tương tác khác cũng không đáng kể (vài phần nghìn) giữa hai hệ phức. Trên thực tế, sự khác biệt giữa hệ CD38-cADPR và hệ E226Q-cADPR nằm duy nhất ở axit amin 226 trong dạng tự nhiên là Glutamic axit (Glu, E) và trong dạng đột biến là Glutamine (Gln, Q). Hơn thế nữa, chỉ ở nhóm nguyên tử: NH<sub>2</sub> (với Gln) và OH (với Glu) trong số hơn 4000 nguyên tử và hơn một vạn phân tử dung môi nước. Tuy vậy, thực nghiệm chỉ ra rằng Glu226 là một axit amin xúc tác, bởi vì khi thay thế nó bằng các axit amin khác, bao gồm Glutamine, tính chất xúc tác của CD38 giảm rất đáng kể. Vậy nên việc thay đổi về cơ bản đặc tính xúc tác của CD38 khi thực hiện đột biến E226Q cần phải được xem xét ở mức độ vi mô những thay đổi về cấu trúc và động lực của phân tử phức.

### IV - CẤU TRÚC CỦA HỆ CD38-CADPR VÀ E226Q-CADPR

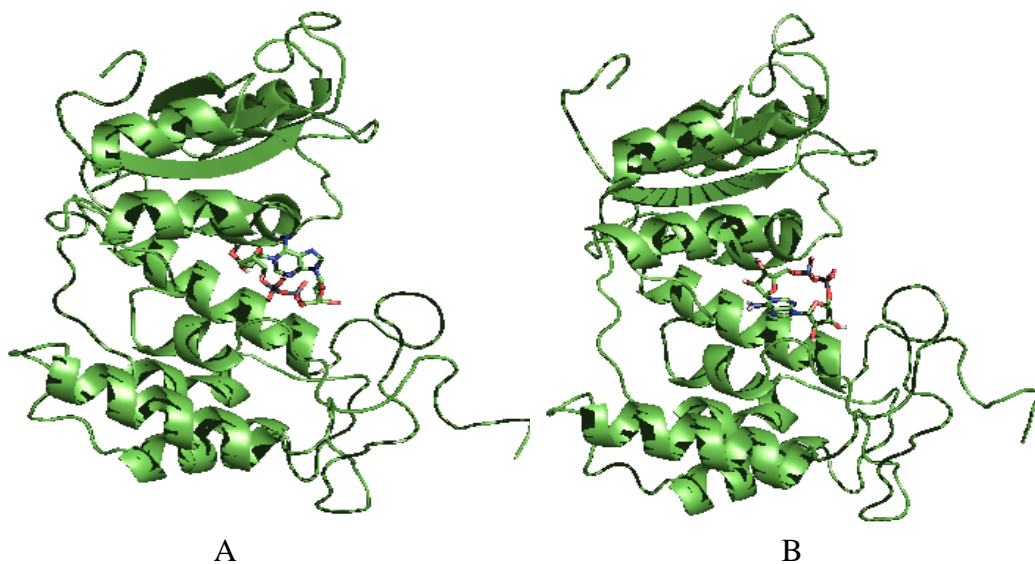
#### Số cặp nguyên tử trung bình, cầu muối và liên kết hydro

Hình 1 trình bày cấu trúc trung bình nhận được sau 1000ps mô phỏng của phức CD38-cADPR và E226Q-cADPR. Một sự khác biệt rõ nét giữa 2 phức CD38-cADPR và E226Q-cADPR là ưu thế của E226Q so với CD38 trong việc tạo liên kết hydro với phối tử cADPR. Hình 2 và bảng 2 trình bày phân bố liên kết hydro cũng như số cặp nguyên tử có khoảng cách nhỏ hơn 3.5Å trong quá trình mô phỏng. Mặc dù cADPR thâm nhập sâu hơn vào vùng tâm hoạt động của CD38 nhưng số liên kết hydro trung bình trong E226Q lại lớn hơn (2,408) so với trong CD38 (1,465). Sự khác biệt này tạo nên tính bền vững tương đối của phức cADPR với E226Q và có thể xem là 1 yếu tố dẫn đến sự

thay đổi hoạt tính xúc tác của CD38 do đột biến.

*Bảng 1:* Một số đại lượng nhiệt động trung bình của hệ CD38-cADPR và hệ E226Q-cADPR

Năng lượng, J/mol	Trung bình		RMSD		Thăng giáng	
	CD38	E226Q	CD38	E226Q	CD38	E226Q
LJ-14	780,518	777,63	62,799	63,1436	52,5331	57,0692
Coulomb-14	25595,4	25298,9	94,9217	93,3721	91,2915	91,1305
LJ (gần)	79022,5	79058,6	614,475	620,731	614,238	620,304
LJ (xa)	-1167,17	-1166,18	3,26857	3,24928	3,20875	3,18298
Coulomb (gần)	-558500	-558895	881,329	893,867	880,907	893,817
Coulomb (xa)	-104816	-104787	82,1441	82,6795	81,7084	81,653
Thế năng	-551285	-551876	540,942	549,135	533,113	545,164
Động năng	99964,7	100002	354,746	355,197	354,739	355,176
Tổng năng	-451321	-451873	409,032	418,788	399,103	412,946
Nhiệt độ (K)	299,984	299,985	1,06456	1,06551	1,06454	1,06545
Áp suất (bar)	0,998209	0,982189	89,1334	90,0445	89,1301	90,0181
T-Protein	299,709	299,731	4,17005	4,19528	4,16972	4,19517
T-CXR	313,071	313,816	30,7006	31,8598	30,6606	31,4089
T-dung môi	299,99	299,988	1,10972	1,11053	1,10972	1,11043
Cv (J/mol K)	12,472	12,472				



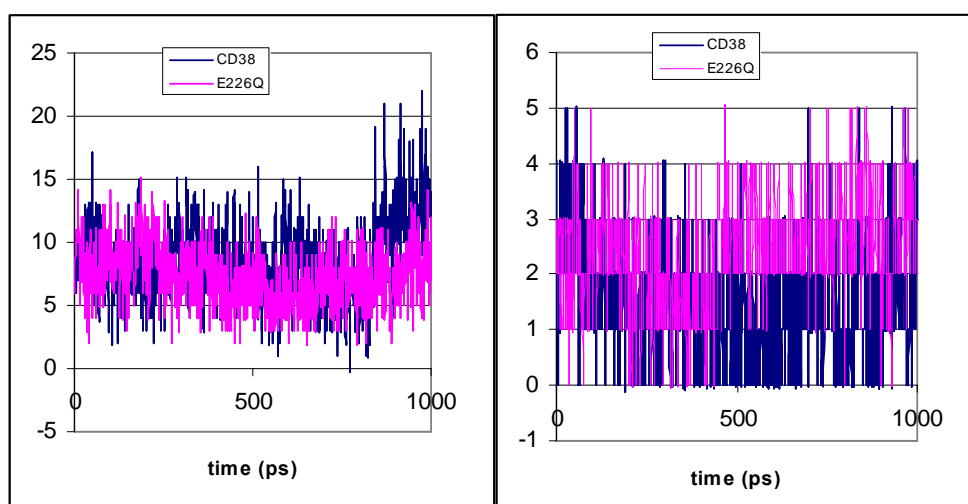
*Hình 1:* Cấu trúc trung bình của CD38-cADPR (A) và E226Q-cADPR (B) sau 100 ps mô phỏng

Tuy vậy, do xâm nhập sâu hơn vào vùng hoạt động mà số cầu muối (saltbridge) - liên kết ion yếu — giữa cADPR với CD38 lại lớn hơn hẳn (6) so với thể đột biến E226Q (3) (xem bảng 2) trong đó có cầu muối tạo với Glu146 một axit amin vốn được xem là tâm xúc tác của phản ứng thủy phân cADPR. Trong trường hợp của cADPR với E226Q cầu muối được tạo chủ yếu với các Arginine

(Arg). Như vậy, có thể kết luận được là: mối liên hệ giữa hoạt tính xúc tác của enzym với cấu trúc vi mô còn được quyết định bởi cầu muối giữa phối tử cADPR và Glu146. CD38 có hoạt tính xúc tác mạnh hơn hẳn so với E226Q [14].

Bảng 2: Liên kết hydro và cầu muối trong phức của cADPR với CD38 và với E226Q

	số liên kết hydro trung bình		Cầu muối với cADPR
	cADPR — protein <sup>+</sup>	cADPR-H <sub>2</sub> O	
CD38	1,465	8,777	Arg127, Arg177, Asp155, Asp156, Glu146, Lys 129
E226Q	2,408	8,037	Arg 127, Arg177, Arg 212



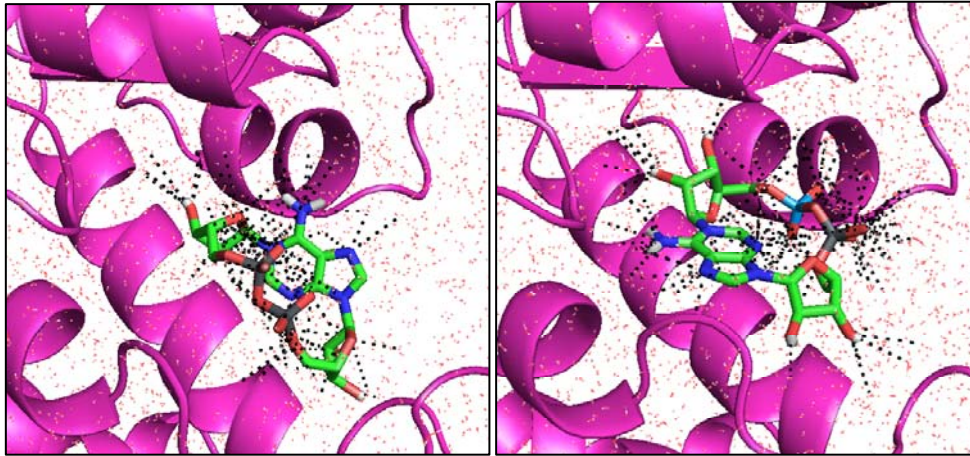
Hình 2: Số cặp nguyên tử có khoảng cách trung bình < 3,5Å (A) và số liên kết hydro (B) giữa phối tử và protein trong quá trình mô phỏng

Phân tích cấu trúc các phân tử nước dung môi cho thấy trong vùng tâm hoạt động của cả CD38 và E226Q đều thấy xuất hiện các phân tử nước (hình 3). Số liên kết hydro trung bình giữa cADPR và các phân tử H<sub>2</sub>O dung môi là lớn (8,777 với CD38 và 8,037 với E226Q). Phân tích cấu trúc liên kết hydro giữa cADPR và H<sub>2</sub>O dung môi trong các cấu hình trung bình của hai phức cho thấy không có sự khác biệt rõ ràng nào có thể ghi nhận được giữa hai lớp vỏ hydrat. Vì vậy, lớp vỏ hydrat cũng không có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính xúc tác của CD38 đối với phản ứng thủy phân cADPR. Điều cần lưu ý là bức tranh liên kết hydro giữa phối tử và protein sẽ thay đổi đáng kể nếu thời gian mô phỏng ngắn, quá trình hydrat hoá sẽ chưa đạt tới cân

bằng.

#### Giản đồ Ramachandran

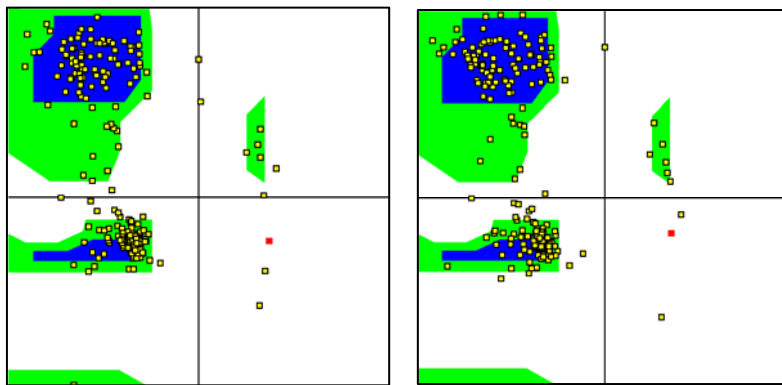
Phân tích giản đồ Ramachandran (hình 4) với cấu trúc trung bình của hai hệ phức sau 1000 ps mô phỏng cho thấy ảnh hưởng của phối tử cADPR đến cấu trúc bậc hai của protein. Trong cả hai phức với CD38 và E226Q đều có axit amin tâm hoạt động (Arg 127) rơi vào vùng góc quay ( $\psi/\phi$ ) bất thường thể hiện sự cưỡng bức. Ngoài ra, sự khác biệt giữa hai giản đồ Ramachandran xác nhận một hiện tượng rất quan trọng trong nghiên cứu cấu trúc phức protein-phối tử đó là sự biến đổi cấu trúc bậc hai của protein trong quá trình tạo phức. Những tính toán cố định tọa độ protein, vì thế, thường không cho kết quả tin cậy.



A

B

Hình 3: Liên kết hydro (- - -) giữa cADPR (que nhiều màu) với các phân tử nước (.) trong các phức với CD38 (A) và thể đột biến E226Q (B)



A

B

Hình 4: Giản đồ Ramachandran của các phức cADPR với CD38 (A) và thể đột biến E226Q (B). Điểm đen biểu diễn Arg 127 minh họa sự cưỡng bức thay đổi cấu trúc protein trong quá trình tạo phức

#### V - CÁC TÍNH CHẤT ĐỘNG HỌC

Tính toán động lực phân tử cho các thông tin về bước chuyển dịch trung bình MSD và hệ số tự khuếch tán D. Dữ liệu ở bảng 3 cho thấy protein có hệ số tự khuếch tán lớn hơn của phối tử cADPR và cả hệ số tự khuếch tán của protein và cADPR trong phức với E226Q đều nhỏ hơn rõ ràng so với phức CD38. Điều này chứng tỏ cADPR tạo phức bền hơn với E226Q so với CD38. Nhận xét này cũng hoàn toàn phù hợp

với các kết quả thu được từ thực nghiệm của Liu và cộng sự [15]. Điều quan trọng là những tính toán tính chất động học của hệ phối tử - protein cần được thực hiện với một số bước mô phỏng đủ lớn. Nếu dựa trên số liệu tính toán của chỉ 500 ps đầu tiên thì những kết luận về hệ số tự khuếch tán của các phức hoàn toàn trái ngược với thực nghiệm (cũng xem bảng 3), hệ số tự khuếch tán của cADPR trong phức với E226Q lại lớn hơn đáng kể so với trong phức với CD38.

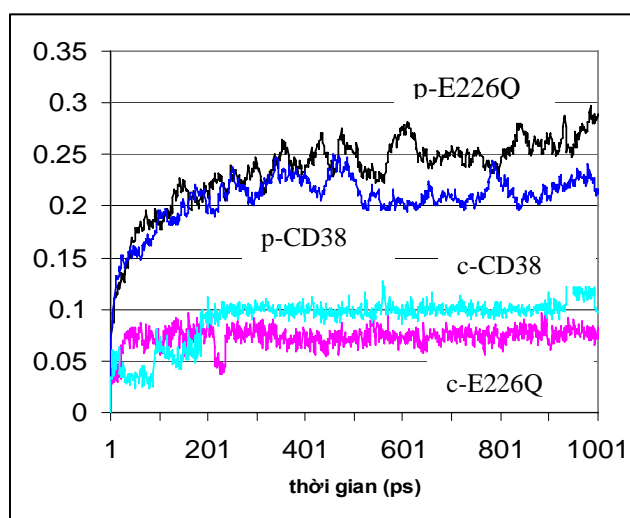
Việc hệ phức phối tử-protein chậm đạt tới cân bằng được thể hiện rõ trong diễn tiến của RMSD của protein và phối tử trong quá trình mô phỏng (hình 5). Dễ dàng nhận ra được rằng cân bằng

động chỉ đạt được sau 400 ps đầu tiên, mặc dù rằng trong khoảng thời gian sau đó (từ khoảng 500 ps trở đi) sự thăng giáng của RMSD, đặc biệt với protein là lớn.

*Bảng 3:* Hệ số tự khuếch tán của protein và cADPR trong phức chất ( $\cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ )

	Protein		cADPR	
	500 ps <sup>+</sup>	1000 ps <sup>++</sup>	500 ps <sup>+</sup>	1000 ps <sup>++</sup>
CD38	0,0461 +/- 0,0769	0,1619 +/- 0,1021	0,0037 +/- 0,0430	0,1393 +/- 0,1702
E226Q	0,0603 +/- 0,0586	0,0753 +/- 0,0937	0,0198 +/- 0,0007	0,0386 +/- 0,0069

<sup>+</sup>tính trung bình trong khoảng 100 đến 400 ps; <sup>++</sup>tính trung bình trong khoảng từ 100 đến 900 ps.



*Hình 5:* RMSD (nm) của protein (p-) và cADPR (c-) trong phức với CD38 và thể đột biến E226Q

## VI - KẾT LUẬN

Áp dụng phần mềm GROMACS nghiên cứu động lực phân tử hệ phức của cADPR với CD38 và thể đột biến E226Q đã xác định được ảnh hưởng của đột biến gen E226Q đến tính chất nhiệt động, cấu trúc, liên kết hydro, cầu muối giữa phối tử và protein, giữa phối tử và phân tử nước dung môi và tính chất động học của phức chất được tạo thành với cADPR. Sự khác biệt về mặt nhiệt động học giữa hai hệ phức là không rõ ràng, trong khi những thay đổi về cấu trúc vi mô và tính chất động học đã giải thích được sự khác biệt giữa CD38 và thể đột biến E226Q về hoạt

tính xúc tác đối với phản ứng thủy phân cADPR. Trong nhiều sự khác biệt giữa hai cấu trúc này thì nguyên nhân chủ yếu vẫn là sự tiếp cận của cADPR với Glu146 trong vùng tâm hoạt động của protein và phức tạo thành giữa cADPR với E226Q bền hơn so với phức giữa cADPR và CD38. Tuy vậy, để hiểu biết sâu hơn về cơ chế hoạt hoá phức trung gian cũng như quá trình hình thành sản phẩm phản ứng vẫn đòi hỏi những nghiên cứu tiếp tục.

*Công trình nhận được sự tài trợ từ Bộ Khoa học và công nghệ thông qua đề tài khoa học cơ bản, mã số 507206. Tác giả xin chân thành cảm ơn.*

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đặng Ứng Vận. Tạp chí Hoá học, T. 46 (2), 188 - 194 (2008).
2. Dang Ung Van, Nguyen Hoa My. Hidemi Nagao Joint Symposium on Computational Chemistry Hanoi, Dec. 21 - 22, P. 24 (2007).
3. Hoàng Hoa, Đặng Ứng Vận. Tạp chí Hoá học (sẽ đăng).
4. [http://www.q-pharm.com/home/contents/news\\_and\\_events](http://www.q-pharm.com/home/contents/news_and_events)
5. <http://www.schrodinger.com/ProductDescription.php?mID=6&sID=6>
6. P. A. Kollman. Chem. Rev., 93, 2395 - 2417 (1993).
7. Gilson M.K., Zhou H.X. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct 36 21-42 (2007).
8. <http://dasher.wustl.edu/tinker/>
9. E. Lindahl, B. Hess, van der Spoel D., J. Mol. Mod. 7 (2001) 306-317; van der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A. E., Berendsen H. J. C. J. Comp. Chem., 26, 1701 - 1719 (2005).
10. Schuettelkopf, A.W., van Aalten D.M.F. Acta Crystallography D60, 1355 - 1363 (2004).
11. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>
12. H. C. Lee. Mo. Med., 12 (11-12) 317 - 323 (2006).
13. Kerrigan J. E. [http://www2.umdj.edu/~kerrigje/pdf\\_files/tp\\_drug\\_tutor.pdf](http://www2.umdj.edu/~kerrigje/pdf_files/tp_drug_tutor.pdf)
14. R. Graeff, C. Munshi, Aarhus, Johns, M. H. and H. H. Lee. J. Biol. Chem. 276 12169 - 12173 (2001).
15. Q. Liu, I. A. Kriksunov, R. Graeff, H. C. Lee and Q. Hao. J. Biol. Chem., 282 5853 - 5861 (2007).