



УДК 577.322.5

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ И ФОРМИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ПОДХОДОВ К ИЗМЕНЕНИЮ СТРУКТУРЫ ГИАЛУРОНИДАЗЫ НА ОСНОВЕ ЕЕ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫМИ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВЫМИ ЛИГАНДАМИ

© 2023 г. А. В. Максименко*, #, Р. Ш. Библашвили*

**Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова
Минздрава России, Россия, 121552 Москва, 3-я Черепковская улица, 15А*

Поступила в редакцию 13.07.2022 г.

После доработки 26.07.2022 г.

Принята к публикации 28.07.2022 г.

На основе данных теоретического изучения в обзоре обосновываются экспериментальные подходы к получению и последующему исследованию модифицированных форм гиалуронидазы. Исследовательское вычислительное рассмотрение взаимодействия 3D-модели бычьей тестикулярной гиалуронидазы (БТГ) с короткоцепочечными гликозаминогликановыми лигандами продемонстрировало разнообразие и значимость их воздействия на структуру фермента. Отмеченное воздействие осуществлялось благодаря электростатическим нековалентным взаимодействиям (без специфического связывания с активным центром), вызывая заметные конформационные изменения молекулы биокатализатора/фермента. В результате таких изменений наблюдались инактивация и стабилизация глобулы фермента, изменение его ингибирования гепарином. Присоединение к молекулярной поверхности гиалуронидазы тримеров хондроитина по центрам sp_6 , sp_3 и sp_1 повышало ее стабильность, а связывание по центрам cs_2 , cs_4 , cs_7 , cs_8 или cs_1 , cs_2 , cs_4 , cs_7 и cs_8 тримеров хондроитинсульфата способствовало снижению ингибирования фермента тетрамером гепарина. К молекуле свободной гиалуронидазы (без лигандов) присоединяются по центрам связывания гликозаминогликановые лиганды с наибольшей энергией связывания. Отмечена важность их связывания для регуляции функционирования фермента, а также наличия многообразного и многокомпонентного микроокружения биокатализатора. Выявленная в теоретическом изучении последовательность предпочтительного связывания лигандов с гиалуронидазой позволяет оценить реальность достижения ее экспериментальной селективной модификации (которая может осуществляться нековалентно и ковалентно, например, с тримерами хондроитинсульфата по центрам cs_7 , cs_1 , cs_5) для потенциального экспериментального получения стабилизированных форм фермента. Перспективными подходами представляются нековалентные воздействия на гиалуронидазу тримеров хондроитина или хондроитинсульфата, как и ковалентная модификация биокатализатора тримером хондроитинсульфата или получение генно-инженерных производных фермента. Упомянутые изменения структуры гиалуронидазы могут способствовать выполнению ее направленного экспериментального дизайна для последующего биомедицинского исследования и практического клинического испытания.

Ключевые слова: бычья тестикулярная гиалуронидаза, пространственная структура фермента, гликозаминогликановые лиганды, нековалентная и ковалентная модификация гиалуронидазы, получение новых лекарственных форм гиалуронидазы

DOI: 10.31857/S0132342323020161, EDN: ZLYRWA

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 370

Сокращения: БТГ – бычья тестикулярная гиалуронидаза; ГАГ – гликозаминогликан; ГН – гиалуронан; ГП – гепарин; ХН – хондроитин; ХС – хондроитинсульфат; $\beta 1AR$ – адренергический рецептор $\beta 1$; 3D – пространственная (третичная) структура фермента.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 414-60-25; эл. почта: alex.v.maks@mail.ru).

ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОГО
ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГИАЛУРО-
НИДАЗЫ С ГЛИКОЗАМИНОГЛИКА-
НОВЫМИ ЛИГАНДАМИ 371ОГРАНИЧЕНИЯ И ЗАТРУДНЕНИЯ
ДАЛЬНЕЙШЕГО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОГО
ВЫПОЛНЕНИЯ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОГО
ТЕОРЕТИЧЕСКОГО ПОДХОДА 372

ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИЕ СИЛЫ В ДОКИНГЕ ГИАЛУРОНИДАЗЫ С КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫМИ ЛИГАНДАМИ	372
ВАЖНОСТЬ ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ СТРУКТУРЫ ГИАЛУРОНИДАЗЫ СЕЛЕКТИВНОЙ ЗАНЯТОСТИ ЦЕНТРОВ ПРИСОЕДИНЕНИЯ ЛИГАНДОВ НА МОЛЕКУЛЯРНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ФЕРМЕНТА	376
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНОГО СВЯЗЫВАНИЯ ГИАЛУРОНИДАЗОЙ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВЫХ ЛИГАНДОВ, ИХ НЕКОВАЛЕНТНЫЕ И КОВАЛЕНТНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ФЕРМЕНТОМ.....	378
РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГИАЛУРОНИДАЗЫ БИОМЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ	380
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	381
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	382

ВВЕДЕНИЕ

Множественные изменения углеводных составляющих исследуемых биологических систем подчеркнули их высокую структурную изменчивость, обусловленную, в частности, воздействием ферментов, способствующих многообразным превращениям и регулирующим метаболические изменения. Количество таких биокатализаторов весьма велико. Среди них следует отметить гиалуронидазу, заметно влияющую на состояние эндотелиального гликокаликса [1]. Последний рассматривается как компонент двойного защитного слоя сосудистой стенки, поддерживающего необходимый для жизнедеятельности организма уровень кровообращения [2]. Функционирование гиалуронидазы осуществляется в различном микроокружении (зачастую из гликозаминогликанов (ГАГ)), выступающем важной частью сосудистого гликокаликса [2, 3]. Исследования метаболизма углеводов подчеркнули важность этого биокатализатора и действенность использования приемов вычислительной биохимии [4–6]. С помощью последних возможно определение на молекулярной поверхности фермента точек чувствительности (при выполнении докинга гиалуронидазы с ГАГ-лигандами) для регуляции активности биокатализатора с целью разработки новых терапевтических средств [7, 8].

Впервые последовательно осуществленное нами пионерное вычислительное изучение с гиалуронидазой позволило обзорно представить его данные в настоящем сообщении и способствовало выделению и проецированию достигнутых эффектов расчетно/теоретически исследованных

взаимодействий биокатализатора с ГАГ-лигандами для обоснования будущих экспериментальных подходов к дальнейшему получению модифицированных производных этого фермента. Материалы нашей работы демонстрируют способы и приемы перехода от теоретических методов изучения к экспериментальным. Важность лечебного сохранения (т.е. в терапевтическом режиме) надлежащего функционирования сосудистой стенки [9, 10], опирающаяся на результаты клинических исследований, подтверждается эффективным использованием ГАГ для восстановления нормальной эндотелиальной функции [11], обуславливая перспективность разработки препаратов гиалуронидазы (пригодных для регуляции размеров ГАГ-покрытия) потенциального кардиологического назначения. Актуальность развития такого исследовательского направления медицины сосудов опирается на сегодняшнее присутствие в арсенале врача в основном средств заместительной терапии, таких как сулодексид [9–11], который представляет собой смесь высокоочищенных ГАГ из высокоподвижного гепарина (80%) и дерматансульфата (20%) [12]. ГАГ способствуют реконструкции эндотелиального гликокаликса, контролируют функционирование ферментов, деградирующих гликокаликс, проявляют противовоспалительное, антиапоптотическое и антивозрастное воздействие на эндотелиальные клетки.

Вычислительное контролирование конформационных изменений ферментной молекулы при взаимодействии с ГАГ-лигандами продуктивно (т.е. с внятным информативным и надежным уровнем) способствует получению и составлению базы теоретических данных регуляции активности биокатализаторов. На основе полученной базы данных обосновывается переход к экспериментальным приемам изучения, перспективы которого раскрываются в данном обзоре. Выполненное расчетное исследование способствует не только согласованию ранее экспериментально полученных данных с вычислительно достигнутыми позднее другими исследователями (что как общий подход в основном и использовалось с иными объектами), но и позволяет обосновать новые рекомендации экспериментального модифицирования свойств изучаемой гиалуронидазы и проверки достигнутых и установленных в нашем изучении теоретических закономерностей для экспериментальной разработки производных этого биокатализатора медицинского назначения следующего поколения.

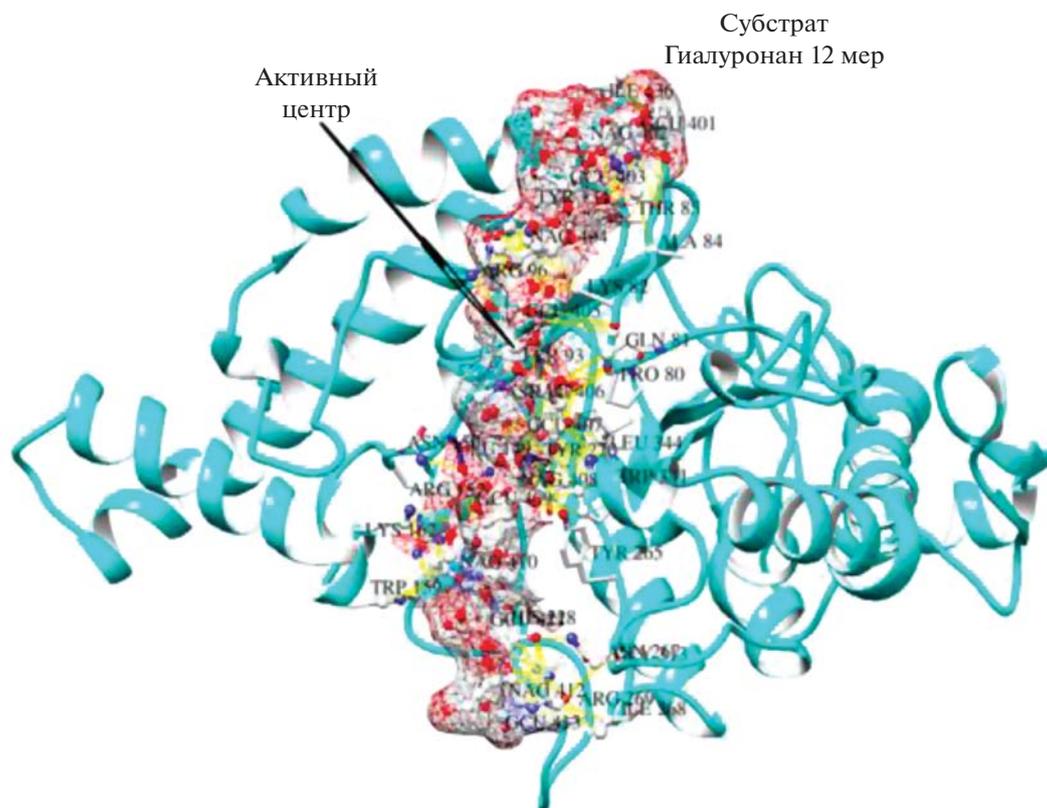


Рис. 1. 3D-модель бычьей тестикулярной гиалуронидазы (БТГ) с додекасахаридом гиалуронана (обозначен как гиалуронан 12-мер), расположенным в субстрат-связывающей “долине”. Поверхность субстрата показана сетчатой формой. Активный центр фермента и место расщепления субстрата расположены между сахаридными остатками C1 NAG408 и C4 GCU409. В формировании активного центра БТГ непосредственно участвуют остатки Tyr93, Asp147, Glu149, Arg152, Lys162, Tyr220, Tyr265, Trp341 и две молекулы воды. Остатки Pro20, Glu81, Lys82, Ala84, Thr85, Arg96, Tyr134, Ile136 и Leu334 удерживают C4-концевой продукт (401–407 а.о.), а Asn150, Arg152, Trp159, His228, Asn267, Ile268, Arg269 и Gly313 удерживают уходящий финальный C1-продукт (409–412 а.о.) [13].

ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОГО ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГИАЛУРОНИДАЗЫ С ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВЫМИ ЛИГАНДАМИ

Теоретическое изучение взаимодействия фермента гиалуронидазы с ГАГ-лигандами продемонстрировало заметное различие проявляющихся при этом эффектов. Для таких исследований нами методом молекулярного гомологичного моделирования была построена 3D-модель бычьей тестикулярной гиалуронидазы (БТГ, рис. 1) по прототипу установленной пространственной структуры гиалуронидазы человека [13]. Для расчетного исследования были отобраны короткоцепочечные (в целях соответствия разрешающей способности программного обеспечения используемого компьютерного оборудования) ГАГ-лиганды: тримеры хондроитина (ХН), хондроитинсульфата (ХС), гиалуронана (ГН) и тетрамеры гепарина (ГП) [1, 14]. С этими ГАГ-лигандами поэтапно был выполнен докинг и изучена моле-

кулярная динамика с 3D-моделью БТГ, данные которых представлены в настоящем обзоре.

Расчеты продемонстрировали, что воздействие тримеров ХН способствует стабилизации ферментативной активности биокатализатора. Температура термоинактивации БТГ в их присутствии возрастала на 10–15°C в сравнении с результатами вычислительного изучения инактивации нативного фермента без лигандов ХН [14]. Теоретически инактивация свободной от ГАГ-лигандов гиалуронидазы была обусловлена существенной разностью потенциалов между правой и левой сторонами субстратной “долины” активного центра фермента (рис. 2а). Под влиянием ионов Na^+ и Cl^- при низкой температуре разность потенциалов заметно снижалась, молекула фермента сохраняла свою структуру даже в отсутствие субстрата. С ростом подвижности ионов при повышении температуры происходило искажение структуры биокатализатора, приводящее к инактивации гиалуронидазы. Докинг лигандов ХН по связывающим центрам гиалуронидазы

(рис. 2б), обозначенным как $cn6$, $cn3$, $cn1$, укрепляя ее структуру, предупреждал конформационные изменения фермента без лигандов ХН, приводящие к сужению входа в активный центр биокатализатора и его денатурации, способствовал повышению термостабильности белка (ср. рис. 3а и рис. 3б) [14].

Полученные данные указывают на перспективность последовательного расчетного изучения взаимодействия фермента с ГАГ-лигандами в целях выяснения закономерностей регуляции его функционирования в биосистемах. Обзорное рассмотрение таких результатов выполненного нами теоретического исследования представлено в настоящем изложении и подтверждается данными других исследований [15]. Так, взаимодействие β -блокатора метопролола с адренергическим рецептором β_1 (β_1AR) сопровождалось образованием комплекса метопролол– β_1AR со значимыми конформационными изменениями внутриклеточного домена рецептора (аналогия с присоединением небольшого метопролола (как лиганда) к связывающему центру макромолекулярного рецептора). Такого не наблюдалось с другими β -блокаторами – атенололом и пропранололом. Отмеченные изменения опосредовали кардиопротекторный эффект метопролола через β_1AR без вовлечения во взаимодействие другого рецептора – β_2AR . Полученные *in vivo* и *in silico* данные обосновывают проведение в будущем клинических испытаний с адекватными дозами и своевременным внутривенным введением метопролола (а не других β -блокаторов) для оценки клинической эффективности предлагаемой стратегии у гемодинамически стабильных пациентов с подъемом ST-сегмента на электрокардиограмме (ЭКГ) при инфаркте миокарда (STEMI) [15].

ОГРАНИЧЕНИЯ И ЗАТРУДНЕНИЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОГО ТЕОРЕТИЧЕСКОГО ПОДХОДА

Имеются критические аспекты используемых нами теоретических приемов. Полученные в ходе

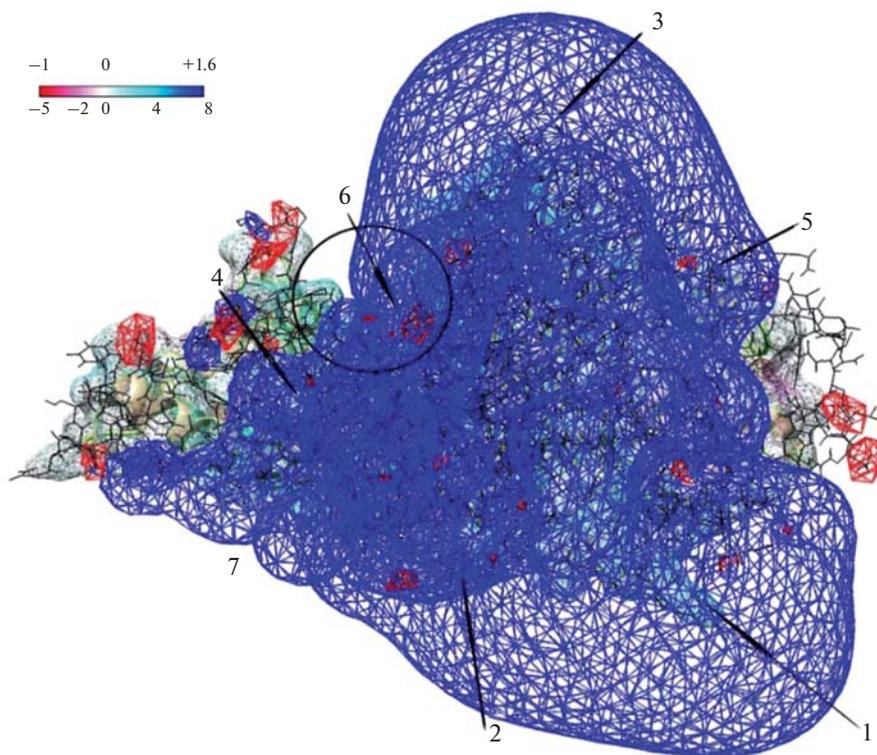
изучения результаты выявляют заметные затруднения при выполнении расчетов с большими виртуальными ячейками и большим числом лигандов из-за отсутствия компьютерных программ с более высокой разрешающей способностью и значимой зависимостью конкурентных взаимодействий исследуемых ГАГ-лигандов от конкретности их исходного распределения (внутри ячейки). Отмеченные сложности указывают лимитирующие пределы развития настоящего исследовательского подхода в его нынешнем виде и намечают направления их продуктивного преодоления (продление сроков действия имеющихся лицензий, приобретение новых бессрочных лицензий программного обеспечения (для возможной работы без обновления программ), заметное расширение высокоэффективными новыми поступлениями компьютерного парка, введение поправок и осуществление изменений российских законодательных норм, разработка отечественных продуктов нового программного обеспечения и др.).

ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИЕ СИЛЫ В ДОКИНГЕ ГИАЛУРОНИДАЗЫ С КОРОТКОЦЕПОЧНЫМИ ЛИГАНДАМИ

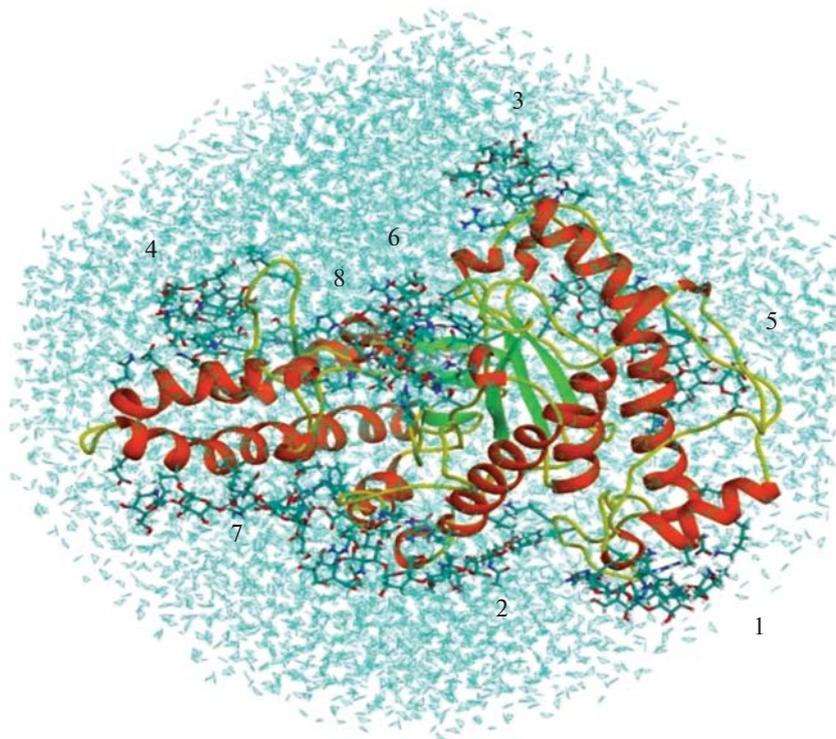
Особенностью поведения нативной гиалуронидазы *in vivo* выступает ее быстрое ингибирование и деградация, подтвержденные данными длительного (>60 лет) медицинского использования этого биокатализатора [16]. Среди множества ингибиторов фермента одним из значимых и заметных выступает гепарин. Вычислительное изучение взаимодействия гиалуронидазы с тетрамерами ГП и тримерами ХС подтвердило высокое ингибирующее действие гепарина [1]. Новым оказался обнаруженный эффект докинга 4–5 тримеров ХС, препятствующих развитию гепаринового ингибирования гиалуронидазы. Эффекторами такой стабилизации активной структуры фермента оказались электростатические взаимодействия [1, 3, 14]. Движущей силой, направляющей передвижение лиганда и приложенной к его центру масс, выступает величина градиента электрического потенциала фермента. Высокая конформа-

Рис. 2. Электростатический потенциал молекулы БТГ в воде (рН 7.5) без учета влияния ионов Na^+ и Cl^- . (а) – Изоповерхностные поверхности обозначены синим (+1.6 В) и красным цветом (–1.2 В). Между правой и левой сторонами субстратной “долины” (выделена черной окружностью) имеется существенная разность потенциалов. На заднем плане показана поверхность молекулы БТГ (выделена зеленым цветом). Цифрами обозначены центры присоединения ХН-лигандов (позиция 8 расположена с дистальной стороны молекулы белка); (б) – по указанным восьми центрам/позициям связывания тримеров ХН (обозначены цифрами) на молекулярной поверхности БТГ происходит присоединение данных лигандов [14]. При этом молекула гиалуронидазы на рисунке ориентирована параллельно главной оси инерции белка вдоль горизонтальной оси, а субстратная “долина” – так, что главная ось инерции додекамерного субстрата перпендикулярна плоскости рисунка. Молекула гиалуронидазы представлена в ленточной форме, α -спиральные участки показаны красным, β -структура – зеленым, остальные элементы структуры – желтым. ГАГ-лиганды показаны в виде мелких шариков, соединенных цилиндрами, ионы Na^+ и Cl^- – мелкими шариками, а молекулы воды – тонкими голубыми линиями. Участки 1, 2, 3 и 7 расположены в плоскости рисунка (1 и 7 посередине, 2 ближе к наблюдателю, а 3 дальше от наблюдателя), участки 4, 5 и 8 – с дистальной стороны молекулы белка, а участок 6 занимает субстратную “долину”, его позиция перпендикулярна плоскости рисунка.

(a)



(б)



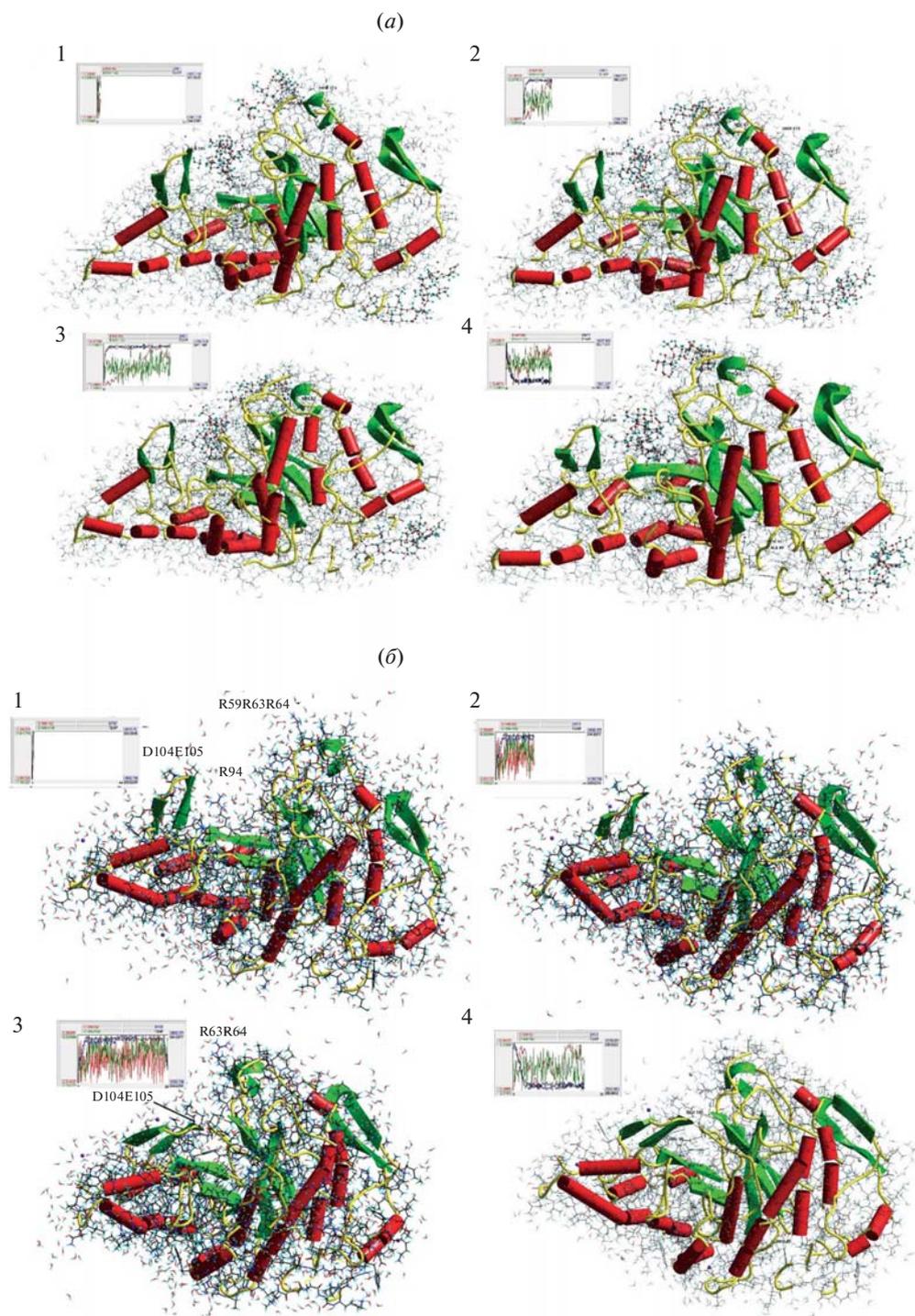


Рис. 3. (а) – Кинетика тепловой денатурации БТГ в комплексе с ХН в положениях 1, 3 и 6 при температуре 340 К со временем наблюдения 3 пс (1), 18 пс (2), 36 пс (3) и 36 + 18 пс после снижения температуры до 287 К (4). На панелях 1–3 показано противодействие термоинактивационному сужению входа в активный центр фермента благодаря взаимодействию биокатализатора с лигандами ХН. Снижение температуры с 340 до 287 К демонстрирует восстановление исходного вида/конформации молекулы фермента (вид 4 сходен с видом 1), свидетельствуя в этом случае об отсутствии ее необратимых денатурационных изменений; (б) – сужение входа в активный центр фермента ясно наблюдается для БТГ без лигандов – в этом случае вход закрывается, приводя к инактивации биокатализатора. Представлена кинетика тепловой денатурации гиалуронидазы, свободной от ГАГ-лигандов, при температуре 320 К со временем расчетного наблюдения 1 пс (1), 17 пс (2), 40 пс (3) и 20 пс после снижения температуры до 287 К (4) [14]. При снижении температуры с 320 до 287 К (4) исходный вид/конформация молекулы фермента не восстанавливается (вид 4 вовсе не похож на вид 1), что указывает на необратимые денатурационные изменения структуры нативной БТГ без лигандов ХН.

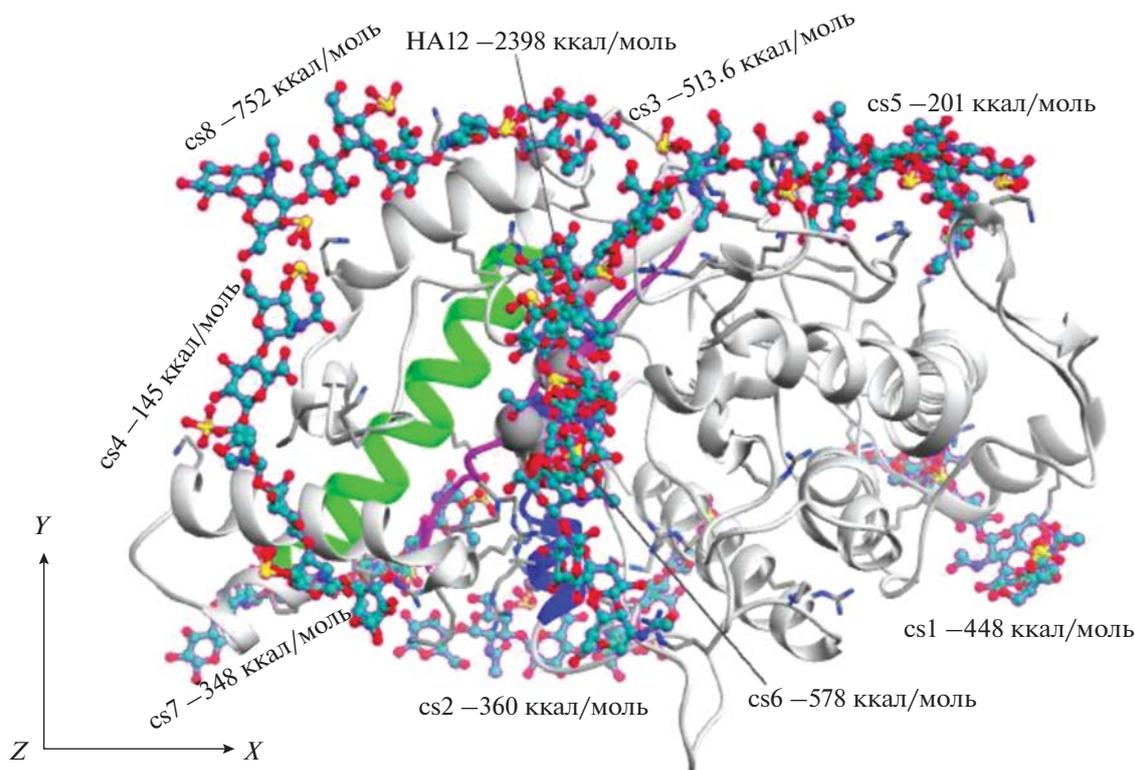


Рис. 4. Расположение восьми центров связывания лигандов ХС (обозначены как cs1–cs8) на 3D-модели БТГ с указанием величин их свободных энергий связывания при 0 К [1]. Изображение представлено в проекции, образованной главными осями инерции додекасахаридного фрагмента субстрата – гиалуронана (HA12, приведен в центре изображения) и БТГ (ось направлена по горизонтали, ось X). Главная ось инерции гиалуронана направлена по вертикали, ось Y. Петля активного центра БТГ между Asp139 и Ala156, включающая в себя Asp147 и Glu149, окрашена сиреневым цветом, протяженная α-спираль от Ala185 до Glu197 обозначена зеленым, а спираль от Glu243 до Glu256 – синим цветом.

ционная гибкость ГАГ (благодаря чему в основном пока только их короткие фрагменты (до тетрамеров) надежно вычислительно докируются) с заметным влиянием растворителя обуславливают продолжающееся совершенствование инструментов расчетного изучения (программного обеспечения) таких процессов [1, 17]. Изменение поверхностного электростатического потенциала свободной гиалуронидазы в результате докинга с восемью тримерами ХС показано нами в теоретическом изучении (рис. 4) [1].

Создаваемое ферментом и его комплексом со всеми восемью лигандами ХС электрическое поле целиком окружает белковую глобулу и примерно повторяет профиль молекулы биокатализатора (рис. 5a). Наиболее эффективными и предпочтительными участками электростатического связывания тримеров ХС предстают центры cs8, cs3, cs1 и cs2, а способствующими снижению гепаринового ингибирования фермента (в соответствии с определенной нами последовательностью предпочтительного связывания ГАГ-лигандов и экспериментально вполне достижимыми) – центры cs8, cs3, cs1, cs4, cs2 и cs7 (рис. 5б) [1]. Вместе с тем центр cs7 с невысокой аффинностью, но наиболее подходящий для ковалентной модифи-

кации (из-за наличия непосредственного контакта с лизиновыми остатками, табл. 1), после ковалентного взаимодействия с тримером ХС может оказаться достаточным для предупреждения ингибирования гиалуронидазы гепарином.

Величины энергий взаимодействия вычисляли в рамках силового поля Amber ff99. Заряды для нестандартных аминокислотных остатков обычно определяли в рамках алгоритма Gastinger. Электростатический потенциал (с проекцией на поверхность молекулы или в растворитель) вычисляли с соотношением Poisson–Boltzmann, принимая диэлектрическую константу при виртуальном растворителе за 80 (вне поверхности макромолекулы) и за 4 (внутри нее). Остатки гистидинов, непосредственно не ассоциированные с аспарагиновой или глутаминовой кислотой, как и с сернокислыми или карбоксильными фрагментами полисахаридов, считали электронейтральными. При проведении вычислений с реальной водой ее генерировали по расчету TIP4Pbox. Величину энтальпии связи определяли как разность между суммой потенциальной энергии лиганда и его связывающего центра с величиной энергии комплекса. Использовали программы NAMD 2.1.4 с VMD 2.1.4 и Amber Tools 20 для

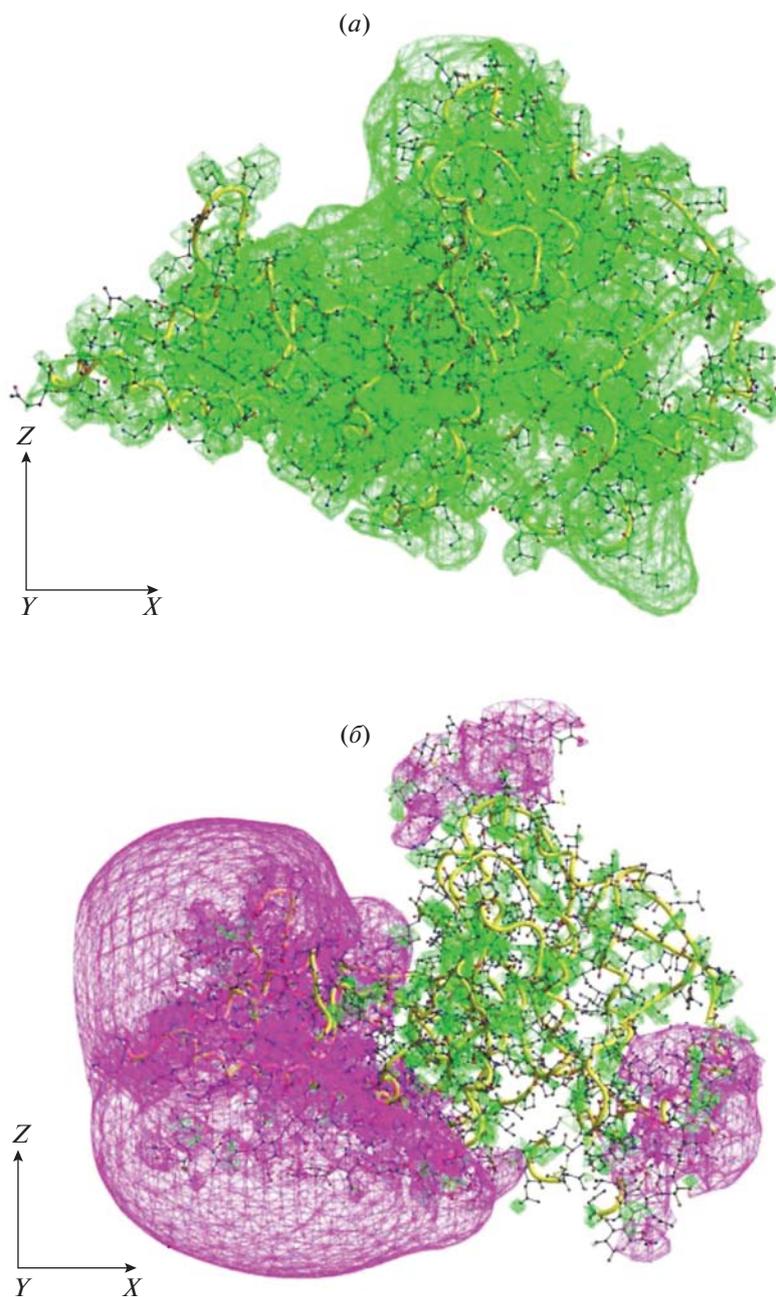


Рис. 5. Вид поверхности изоэлектрического потенциала (по уровню $0.4 e/a_0$) молекулы БТГ. Отрицательные значения электростатического потенциала окрашены в сиреневый/темно-серый цвет, положительные – в зеленый/светло-серый. (а) – Свободная БТГ; (б) – БТГ с шестью лигандами ХС по центрам cs7, cs1, cs2, cs3, cs4, cs8 и гепариновым лигандом в зоне cs6 демонстрирует действие лиганда ХС по центру cs7, стабилизирующее структуру БТГ [1].

Linux или NAMD 2.1.2 с VMD 1.9.3 и Amber Tools 18 для Windows. Для подготовки иллюстраций применяли программу UCSF Chimera 1.13.1.

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности обоснования и составления рекомендаций на основе расчетных данных теоретических исследований взаимодействий гиалуронидазы с короткоцепочечными ГАГ-лигандами для экспериментального получения ее стабилизированных форм лечебного назначения.

ВАЖНОСТЬ ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ СТРУКТУРЫ ГИАЛУРОНИДАЗЫ СЕЛЕКТИВНОЙ ЗАНЯТОСТИ ЦЕНТРОВ ПРИСОЕДИНЕНИЯ ЛИГАНДОВ НА МОЛЕКУЛЯРНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ФЕРМЕНТА

Значимой особенностью стабилизации (против термоинактивации) структуры 3D-модели гиалуронидазы в результате взаимодействия с три-

Таблица 1. Величина энергии взаимодействия ГАГ-лигандов (тримеров ХН и ХС) с 3D-моделью бычьей тестикулярной гиалуронидазы* (БТГ) в среде без H₂O и Na⁺

Лиганды ХН (сн) и другие компоненты взаимодействия	Энергия взаимодействия БТГ с ХН-лигандами, ккал/моль	Лиганды ХС (сs) и другие компоненты взаимодействия	Энергия взаимодействия БТГ с ХС-лигандами, ккал/моль	Аминокислотные остатки БТГ, доступные для контакта с лигандом по соответственно указанному центру/позиции на молекуле фермента
cn1	–(280–320)	cs1	–448.5	Lys446 Lys447 Lys430
–	–	cs2	–360.2	Lys292 Lys244 Arg245 Lys255 Lys256
cn3	–(310–420)	cs3	–513.6	Her Lys Arg59 Arg63 Arg64
–	–	cs4	–145.5	Lys109
–	–	cs5	–201.6	Lys416 Lys77
cn6	–(620–690)	cs6	–577.6	Her Lys
–	–	cs7	–348.1	Lys187 Lys198 Arg246 Asp249 Leu250 Trp252 Glu184 Ile188 Glu194 Pro153 Thr154
–	–	cs8	–752.2	Lys129
HA ₁₂ (додекасахарид гиалуронана)	–2398	–	–	–
сн (свободный тример ХН)	–320	–	–	–
сs (свободный тример ХС)	–148	–	–	–

* Выявленные на молекулярной поверхности гиалуронидазы восемь потенциальных центров связывания тримерных лигандов ХН и ХС сходны друг с другом [14].

мерами ХН [14, 18], в сравнении с антиингибирующим эффектом тримеров ХС (в отношении тетрамеров ГП) [1, 19], оказалась селективная занятость центров связывания ГАГ-лигандов на молекулярной поверхности фермента. Согласно результатам расчетов, стабилизирующее воздействие других ГАГ-лигандов оказалось существенно менее выраженным. Теоретически показано, что три тримера ГН могут первоначально присоединиться к глобуле биокатализатора (рис. 6а), а введенный в систему тример ХС эффективно вытесняет с третьего центра связывания молекулы гиалуронидазы тример ГН (рис. 6б) [20]. Экспериментально продемонстрировано меньшее стабилизирующее действие на фермент гликозидной $\beta(1-4)$ -связи целлобиозы (рассматриваемой как структурный аналог гиалуронана) по сравнению с эффектом гликозидной $\alpha(1-4)$ -связи мальтозы [21].

Стабилизация структуры гиалуронидазы проявлялась благодаря электростатическому присоединению тримера ХН уже по одному центру связывания ch6 (как и по трем ch6, ch3, ch1 и более), а для предотвращения гепаринового ингибирования биокатализатора тримерами ХС оказалось необходимым их связывание по четырем (cs2, cs4, cs7 и cs8) или пяти (cs1, cs2, cs4, cs7 и cs8) позициям, теоретически достаточным для предупреждения необратимых деформаций молекулы фермента при поступлении лиганда ГП в зону активного центра. В настоящее время следует отметить интенсивное изучение полимер-белковых конъюгатов [22] для расширения на их основе арсенала лекарственных средств, предложение и использование для этого модифицированных биокатализаторов [23]. Возможно, целесообразность достижения контролируемой гетерогенности получаемого продукта, регулярно технологически воспроизводимого по своим параметрам, требует неукоснительного использования только единственного центра присоединения модификатора на белковой молекуле [24].

Величина свободной энергии связывания на молекулярной поверхности гиалуронидазы ГАГ-лигандов оказалась по крайней мере в 2 раза выше энергии самих лигандов в свободном состоянии (табл. 1). Длина цепи ГАГ-лиганда влияет на его присоединение к ферменту. Производные лигандов с длинными цепями связываются эффективнее, чем короткоцепочечные (димеры–тетрамеры), аффинность которых снижается. Имеющиеся ограничения программ расчета (программного обеспечения) белкового докинга, влияющие на надежность получаемых результатов, определяют предпочтительность его начального изучения с достаточно короткими ГАГ-лигандами, которые с наибольшей величиной свободной энергии связывания эффективно присоединяются к молекуле нативной гиалуронидазы по ее соответствующим

центрам связывания [17]. Развитие контактов ГАГ-лигандов с гиалуронидазой, как уже отмечалось выше, обусловлено электростатическими взаимодействиями (в результате контактов с аргининами, а при проведении ковалентной модификации фермента – с лизинами) без специфического связывания с активным центром биокатализатора.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНОГО СВЯЗЫВАНИЯ ГИАЛУРОНИДАЗОЙ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВЫХ ЛИГАНДОВ, ИХ НЕКОВАЛЕНТНЫЕ И КОВАЛЕНТНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ФЕРМЕНТОМ

Электростатический потенциал молекулы гиалуронидазы меняется при докинге с ГАГ-лигандами (рис. 2а) [1]. Положительный знак потенциала свободного фермента становится отрицательным с присоединением восьми тримеров ХС со стабилизацией структуры биокатализатора благодаря не только появлению у его молекулы отрицательных зарядов, но и формированию определенного вида его электростатического потенциала [1, 17]. Установленная в изучении последовательность предпочтительного связывания ГАГ-лигандов с гиалуронидазой реализует ее (названную последовательность) в присутствии субстрата (в нашем случае додекасахарида ГН, выбранного для упрощения иллюстрирования данных, по мере увеличения концентрации тримерного ХС-лиганда): $cs8 > cs6 > cs3 > cs1 > cs2 \gg cs7 \gg cs5$. Со свободным ферментом без субстрата последовательность меняется следующим образом: $cs8 > cs3 > cs1 > cs4 > cs2 \gg cs7 \gg cs5$; при ковалентном связывании ГАГ-лигандов (после их бензохиноновой активации) по лизиновым остаткам фермента последовательность другая: $cs7 > cs1 > cs5 \gg cs2, cs8, cs4$ [17]. Наибольший эффект стабилизации активности гиалуронидазы достигается при докинге тримера ХН по центру sn6 и по центрам sn6, sn3 и sn1 посредством электростатического нековалентного взаимодействия (рис. 3б), а с тримерами ХС – по центрам cs2, cs4, cs7 и cs8 или cs1, cs2, cs4, cs7 и cs8 (рис. 5б). Ковалентное присоединение тримера ХН к гиалуронидазе по центру sn6 (или sn6, sn3 и sn1) экспериментально может оказаться весьма затрудненным, поскольку около центров sn6 и sn3 нет лизиновых остатков, доступных для контакта с лигандом, а имеются три лизиновых остатка лишь по позиции sn1 (табл. 1). А вот ковалентная модификация гиалуронидазы тримером ХС по центру cs7 фермента (или cs7, cs1, cs5) может оказаться вполне достаточной для предотвращения ингибирования фермента гепарином [1, 17]. Возможно, множественность (с обилием ГАГ-лигандов) воздействия на гиалуронидазу ХС- или ХН-лигандов поддержит и укрепит

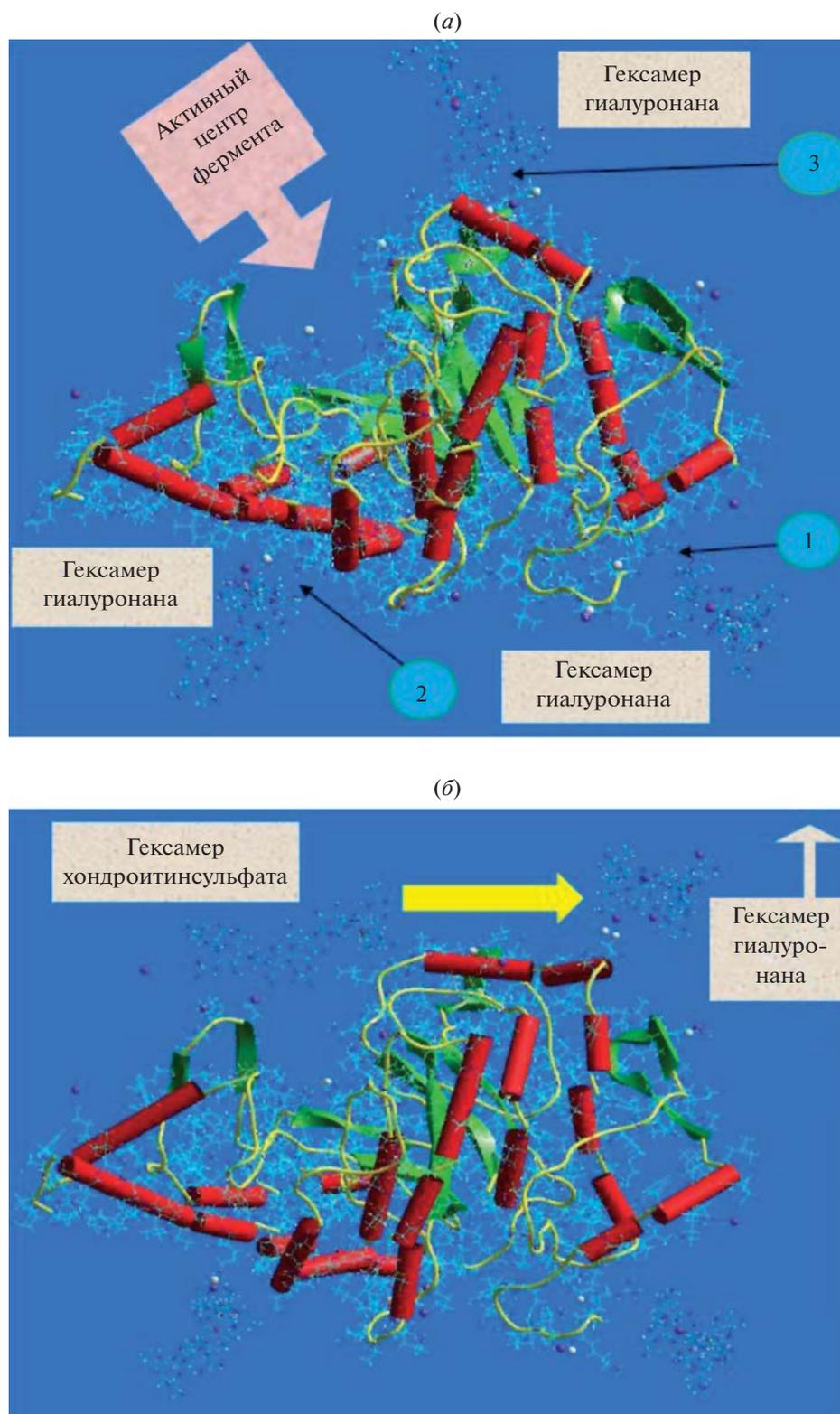


Рис. 6. Начальное/стартовое состояние расчетного наблюдения (а), когда три гексамера ГН занимают свои позиции по центрам связывания (1–3) на глобуле гиалуронидазы при 310 К (поддерживается указанная температура); (б) – вытеснение гексамера ГН (на рисунке сверху справа, уходящий лиганд) с третьего центра его связывания (показано стрелкой) на молекулярной поверхности гиалуронидазы гексамером ХС (расположенным над входом или у входа в “долину” активного центра биокатализатора, ХС-лиганд становится связывающимся с глобулой фермента новым лигандом) на 2.0 нс времени расчетного наблюдения изучаемого конкурентного взаимодействия ХС- и ГН-лигандов с ферментом [20].

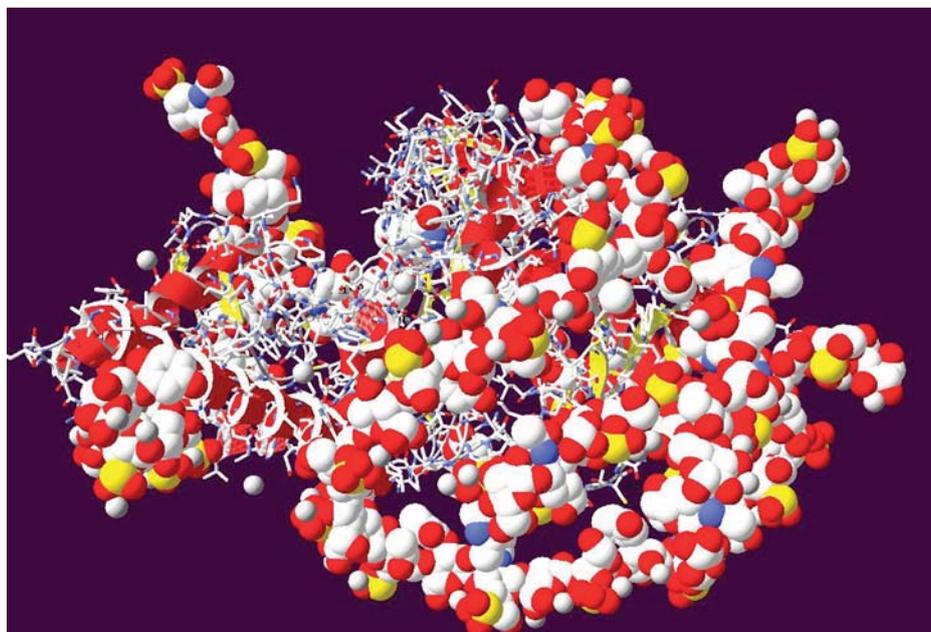


Рис. 7. Модельная структура молекулы гиалуронидазы, ковалентно связанной почти по всем лизиновым остаткам фермента с полимерной формой хондроитинсульфата [13]. Глобула биокатализатора оказывается окруженной ХС-оболочкой (представлена разноцветными фрагментами сфер, дисками, цилиндрами) с сохранением доступа к активному центру фермента.

пит значимое для функционирования биокатализатора многообразие его микроокружения [17–19]. Следует напомнить, что расчетное построение 3D-модели ковалентного конъюгата гиалуронидазы с высокомолекулярной формой ХС (120–140 кДа) при практически полном блокировании лизиновых остатков биокатализатора позволяет окружить его глобулу ХС-оболочкой с сохранением доступности к активному центру (рис. 7) [3, 13], подчеркивая эту особенность фермента при формировании его достаточно плотного микроокружения. Представленные данные обоснованно свидетельствуют о возможной стабилизации активности фермента в результате нековалентного и ковалентного взаимодействия с ГАГ-лигандами.

РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГИАЛУРОНИДАЗЫ БИОМЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

По величине укрепления структуры 3D-модели гиалуронидазы (благодаря нековалентным электростатическим взаимодействиям) теоретически выделяются эффективность своего докинга тримеры ХН и ХС [1, 14]. Действительно, присоединение уже одного тримера ХН по единственному центру связывания на молекулярной поверхности биокатализатора $cn6$ способствует заметному увеличению стабильности фермента.

Такой же результат обнаружен при докинге тримеров ХН по трем и более связывающим позициям $cn6$, $cn3$, $cn1$ на гиалуронидазе [14]. Отмеченные теоретические особенности докинга гиалуронидазы с тримерами ХН подчеркивают обоснованность экспериментального изучения свойств комплекса фермента с ХН-лигандами при обработке биокатализатора предположительно эквимолекулярными с ферментом концентрациями тримера ХН либо его избыточными количествами.

Докинг гиалуронидазы с тримерами ХС обнаруживает эффект, стабилизирующий структуру фермента благодаря присоединению тримеров ХС по 4–5 центрам связывания: $cs2$, $cs4$, $cs7$, $cs8$ или $cs1$, $cs2$, $cs4$, $cs7$, $cs8$ [1, 17]. С учетом влияния выявленной нами последовательности предпочтительного присоединения ГАГ-лигандов к гиалуронидазе [17], реально экспериментально достижимой оказывается занятость центров $cs8$, $cs3$, $cs1$, $cs4$, $cs2$ и $cs7$. Вероятно, приведенные данные подразумевают экспериментально рекомендуемую обработку нативной гиалуронидазы избытком тримеров ХС.

Ковалентная модификация нативной гиалуронидазы ГАГ-лигандами теоретически демонстрирует значимые затруднения для осуществления стабилизирующего структуру биокатализатора присоединения к ферменту тримеров ХН по центру $cn6$ или центрам $cn6$, $cn3$ и $cn1$ [17]. Обнаруживается недостижимость отмеченной селективной занятости указанных центров связывания

ХН-лигандов на ферментной глобуле (табл. 1), когда последовательность их ковалентного предпочтительного связывания реально демонстрирует лишь экспериментальную достижимость присоединения тримеров ХН по ограниченному набору центров, а именно $cn_7, cn_1, cn_5; cn_2, cn_8, cn_4$ (а вовсе не cn_6, cn_3, cn_1). Отмеченное положение внушает заметные сомнения в эффективности развития такого направления экспериментальной ковалентной модификации гиалуронидазы. Теоретически более перспективной и реально экспериментально достижимой выступает ковалентная модификация фермента тримером ХС по центру (единственному) cs_7 , как и по трем центрам cs_7, cs_1, cs_5 (с экспериментально используемыми эквимолекулярными концентрациями биокатализатора и тримеров ХС либо с избыточным присутствием последнего) [17].

Стабилизация структурной организации биокатализатора достигается также благодаря использованию методов биологического синтеза для получения модифицированных генно-инженерных ферментных производных (пригодных и для выпуска гиалуронидазы). Так, в результате замены первых 24 а.о. *N*-концевого рецептор-связывающего домена (по сравнению с природной формой белка) была получена рекомбинантная проурокиназа (пууролаза), эффективно вошедшая в отечественную клиническую практику тромболитической терапии [25]. На основе генно-инженерной технологии разработана неиммуногенная стафилокиназа (коммерческий рекомбинантный фортелизин), продемонстрировавшая эффективное и безопасное фибринолитическое действие у пациентов с инфарктом миокарда (с подъемом ST-сегмента на электрокардиограмме) [26, 27]. Заявляемая потребность и перспективность перехода от тромболитика только одним препаратом к комбинированному (с применением нескольких тромболитиков) фибринолізу с использованием как триггера тканевого активатора плазминогена с поддерживающим действием проурокиназы [28] или модифицированных форм урокиназы [29] указывает на неослабевающее стремление специалистов научно-клинической сферы к повышению эффективности тромболитической терапии. Этому способствует и получение новых модифицированных форм ферментов [30], в том числе гиалуронидазы [1, 3, 13, 14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе данных теоретического изучения взаимодействия гиалуронидазы с ГАГ-лигандами [1, 14, 17, 19] обосновываются приведенные выше рекомендации экспериментального получения стабилизированных медицинских форм этого фермента в результате нековалентных электростатических взаимодействий фермента с триме-

рами ХН или ХС, как и благодаря ковалентной модификации биокатализатора тримерами ХС. Экспериментальное изучение биохимических свойств названных нековалентных и ковалентных комплексов фермента с ХН- или ХС-лигандами способствует выбору для биомедицинской апробации на модельных поражениях системы кровообращения у животных наиболее предпочтительных по устойчивости и уровню ферментативной активности названных производных гиалуронидазы для их объективной критической оценки [31]. Дополнительным ресурсом стабилизации активной структуры гиалуронидазы (после взаимодействия фермента с ГАГ-лигандами на первом этапе его модификации) может оказаться последующее окружение глобулы биокатализатора ХС-оболочкой [3, 13]. Так, ковалентное связывание бычьей гиалуронидазы с высокомолекулярным носителем (сополимером *N*-оксида 1,4-этиленпиперазина и (*N*-карбоксиметил)-1,4-этиленпиперазиний бромида) способствовало коммерческому выпуску препарата Лонгидаза (ООО "НПО Петровакс Фарма", Россия) [32, 33], продемонстрировавшего выраженные антифибротические свойства. Перспективным представляется и получение медицинских генно-инженерных конструкторов гиалуронидазы разного доменного состава (с возможным удалением какого-то из доменов (например, домена эпидермального фактора роста или его части), что будет определяться по результатам предварительных экспериментов). Это подтверждается данными результатов клинического использования генно-инженерного препарата Пууролаза (НМИЦ кардиологии имени академика Е.И. Чазова, Москва, Россия), показавшего эффективность таких белковых производных тромболитического назначения для действенного применения в практике неотложной кардиологии [25].

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации (госзадание НМИЦ кардиологии имени академика Е.И. Чазова, тема 121031300189-3).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Представленный материал не содержит описания исследований, проведенных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Максименко А.В., Бибилашвили Р.Ш. // Биоорг. химия. 2018. Т. 44. С. 147–157. [Maksimenko A.V., Beabealashvili R.S. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 165–172.] <https://doi.org/10.1134/S1068162018020048>
2. Reitsma S., Slaaf D.W., Vink Y., van Zandvoort M.A., onde Egbrink M.G. // Pflüger's Arch. 2007. V. 454. P. 345–359. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0212-8>
3. Maksimenko A. // Cardiology and Cardiovascular Res. 2020. V. 4. P. 220–230.
4. Chandel N.S. // Cold Spring Harbor Perspective Biol. 2021. V. 13. P. 1–7. <https://doi.org/10.1101/cshspect.040568>
5. Sankaranarayanan N.V., Nagarajan B., Desai U.R. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2018. V. 50. P. 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.12.004>
6. Yang J., Chi L. // Carbohydr. Res. 2017. V. 452. P. 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.10.008>
7. Nieuwdorp M., Meuwese M.C., Vink H., Hoekstra J.B., Kastelein J.J., Stroes E.G.S. // Curr. Opin. Lipidol. 2005. V. 16. P. 507–511. <https://doi.org/10.1097/01.mol.0000181325.08926.9c>
8. Broekhuizen L.N., Mooij H.L., Kastelein J.J., Stroes E.G.S., Vink H., Nieuwdorp M. // Curr. Opin. Lipidol. 2009. V. 20. P. 57–62. <https://doi.org/10.1097/mol.0b013e328321b587>
9. Andreozzi G.M. // Int. Angiol. 2014. V. 33. P. 255–262.
10. Coccheri S. // Int. Angiol. 2014. V. 33. P. 263–274.
11. Masola V., Zaza G., Onisto M., Lupo A., Gambaro G. // Int. Angiol. 2014. V. 33. P. 243–254.
12. Manello F., Ligi D., Raffetto J.D. // Int. Angiol. 2014. V. 33. P. 236–242.
13. Максименко А.В., Турашев А.Д., Бибилашвили Р.Ш. // Биохимия. 2015. Т. 80. С. 348–357. [Maksimenko A.V., Turashev A.D., Beabealashvili R.S. // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. P. 284–295.] <https://doi.org/10.1134/S0006297915030049>
14. Максименко А.В., Бибилашвили Р.Ш. // Биоорг. химия. 2020. Т. 46. С. 151–157. [Maksimenko A.V., Beabealashvili R.S. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 181–186.] <https://doi.org/10.1134/S1068162020020156>
15. Clemente-Moragon A., Gomez M., Villena-Gutierrez R., Lalama D.V., Garcia-Prieto J., Martinez F., Sanchez-Cabo F., Fuster V., Oliver E., Ibanez B. // Eur. Heart J. 2020. V. 41. P. 4425–4440. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa733>
16. Jung H. // Arch. Plast. Surg. 2020. V. 47. P. 297–300. <https://doi.org/10.5999/aps.2020.00752>
17. Максименко А.В., Бибилашвили Р.Ш. // Изв. Акад. наук. Серия хим. 2018. Т. 67. С. 636–646. <https://doi.org/10.1007/s11172-018-2117-4>
18. Максименко А.В., Сахарова Ю.С., Бибилашвили Р.Ш. // Кардиологич. вестник. 2021. Т. 16. С. 15–22. <https://doi.org/10.17116/Cardiobulletin20211603115>
19. Максименко А.В., Сахарова Ю.С., Бибилашвили Р.Ш. // Кардиологич. вестник. 2021. Т. 16. С. 17–25. <https://doi.org/10.17116/Cardiobulletin202116041157>
20. Максименко А.В., Ваваева А.В., Сахарова Ю.С., Ваваев А.В., Бибилашвили Р.Ш. // Кардиологич. вестник. 2022. Т. 17. С. 39–43. <https://doi.org/10.17116/Cardiobulletin20221703139>
21. Турашев А.Д., Тищенко Е.Г., Максименко А.В. // Мол. медицина. 2009. № 6. С. 50–55.
22. Zaghmi A., Greschner A.A., Gauthier M.A. // In: Polymer-Protein Conjugates / Eds. Pasut G., Zalipsky S. Elsevier, 2020. P. 389–406. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64081-9.00017-6>
23. Maneval D.C., Caster C.L., Derunes C., Locke T.W., Muhsin M., Sauter S., Sekulovich R.E., Thompson C.B., LaBarre M.J. // In: Polymer-Protein Conjugates / Eds. Pasut G., Zalipsky S. Elsevier, 2020. P. 175–204. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64081-9.00009-7>
24. Ferguson E.L., Varache M., Stokniene J., Thomas D.W. // In: Polymer-Protein Conjugates / Eds. Pasut G., Zalipsky S. Elsevier, 2020. P. 421–453. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64081-9.00019-X>
25. Миленкина С.Г., Дельвер Е.П., Белогуров А.А., Бибилашвили Р.Ш., Арзамасцев Е.В., Староверов И.И. // Кардиологич. вестник. 2019. Т. 15. С. 12–21. <https://doi.org/10.36396/MS.2019.15.4.002>
26. Марков В.А., Дуляков Д.В., Константинов С.Л., Клейн Г.В., Аксентьев С.Б., Платонов Д.Ю., Вышков Е.В., Пономарев Е.А., Рабинович Р.М., Макаров Е.Л., Кулибаба Е.В., Юневич Д.С., Крицкая О.В., Баранов Е.А., Талибов О.Б., Герасимец Е.А. // Рос. кардиологич. журнал. 2018. Т. 23. С. 110–116. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2018-11-110-116>
27. Марков В.А., Дуляков Д.В., Константинов С.Л., Клейн Г.В., Аксентьев С.Б., Платонов Д.Ю., Вышков Е.В., Пономарев Е.А., Рабинович Р.М., Макаров Е.Л., Кулибаба Е.В., Крицкая О.В., Баранов Е.А., Талибов О.Б., Герасимец Е.А. // Кардиологич. вестник. 2017. Т. 12. № 3. С. 52–59.
28. Gurevich V. // Cardiol. Vascular Res. 2021. V. 5. P. 1–3.
29. Maksimenko A.V., Tischenko E.G. // J. Thromb. Thrombolys. 1999. V. 7. P. 307–312. <https://doi.org/10.1023/a:1008939428688>
30. Максименко А.В. // Acta Naturae. 2012. Т. 4. С. 76–86. [Maksimenko A.V. // Acta Naturae. 2012. V. 4. P. 72–81.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23150805>
31. Maksimenko A., Turashev A., Fedorovich A., Rogoza A., Tischenko E. // J. Life Sci. 2013. V. 7. № 2. P. 171–188.
32. Trizna E., Baidamshina D., Gorshkova A., Drucker V., Bogachev M., Tikhonov A., Kayumov A. // Pharmaceutics. 2021. V. 13. P. 1740. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111740>
33. Кульчавеня Е.В., Шевченко С.Ю., Чередниченко А.Г., Бреусов А.А., Винницкий А.А. // Урология. 2020. № 3. С. 56–62. <https://doi.org/10.18565/urology.2020.3.56-62>

Theoretical Grounding and Formation of Experimental Approaches to Hyaluronidase Structure Consolidation due to Its Computational Interactions with Shortchain Glycosaminoglycan Ligands

A. V. Maksimenko*, # and R. Sh. Beabealashvili*

#Phone: +7 (495) 414-60-25; e-mail: alex.v.maks@mail.ru

*National Medical Research Centre of Cardiology named after academician E.I. Chazov,
ul. 3-ya Cherepkovskaya 15A, Moscow, 121552 Russia

The computational study of 3D model hyaluronidase interaction with shortchain glycosaminoglycan ligands demonstrated the diversity and significance of their reaction on enzyme structure. It has been realized due to electrostatic noncovalent interactions (without specific coupling with active site) inducing the perceptible conformational alterations of biocatalyst molecule. As a result of this the inactivation and stabilization of enzyme globule are observed, change of inhibition of biocatalyst by heparin. The binding of chondroitin trimers (on centers cn6, cn3, cn1) to hyaluronidase molecular surface increased the enzyme stability, binding of chondroitin sulfate trimers (on centers cs2, cs4, cs7, cs8 or cs1, cs2, cs4, cs7, cs8) decreased the inhibition of enzyme by tetramer heparin. It should be noted the importance of ligand binding for regulation of enzyme functioning and existence of multiform and multicomponent microenvironment of enzyme. The sequence of preferable coupling of ligands with hyaluronidase is elicited in our study and with its help was evaluate reality of experimental selective modification of enzyme (possibly no covalently or covalently, for instance, with chondroitin sulfate trimers on centers cs7, cs1, cs5) for experimental obtaining of stabilized enzyme forms of medical destination. The perspective approaches for this aim may be the no covalent reaction on hyaluronidase by chondroitin or chondroitin sulfate trimers as well covalent modification of biocatalyst by chondroitin sulfate trimers.

Keywords: bovine testicular hyaluronidase, tertiary enzyme structure, glycosaminoglycan ligands, noncovalent and covalent modification of hyaluronidase, obtaining of new hyaluronidase drug