

заполнив тем самым последнюю брешь на участке до RSA-200. Построение многочлена, определяющего числовое поле, было выполнено в МГУ на «Чебышеве» (100 процессоров и 4 дня работы). Нахождение соотношений просеиванием выполнялось в основном на ресурсах CWI (в МГУ выполнено 20% этой работы) и заняло почти все лето 2010 г. В результате было найдено более 1 миллиарда соотношений. После фильтрации была получена матрица размером около 33 млн строк и столбцов. Этот процесс занял порядка 38 часов на 1 процессоре «Чебышева». Получившаяся система уравнений решалась на 900 процессорах «Ломоносова», на что потребовалось около 37 часов. Завершающий этап выполнялся еще примерно 110 часов на 1 процессоре «Чебышева» и потребовал большого количества оперативной памяти, для чего были задействованы узлы с памятью 32 Гб. На «Ломоносове», где узлы по 16 Гб, на этапе фильтрации и построения матрицы памяти не хватало.

RSA-190 = 190755640506069649106145043264602886108117975953318
446064797562231891502558718417575405497615512159329349226046415263
009323850924660320741712472612158085818598593894694549048172175640
1423481.

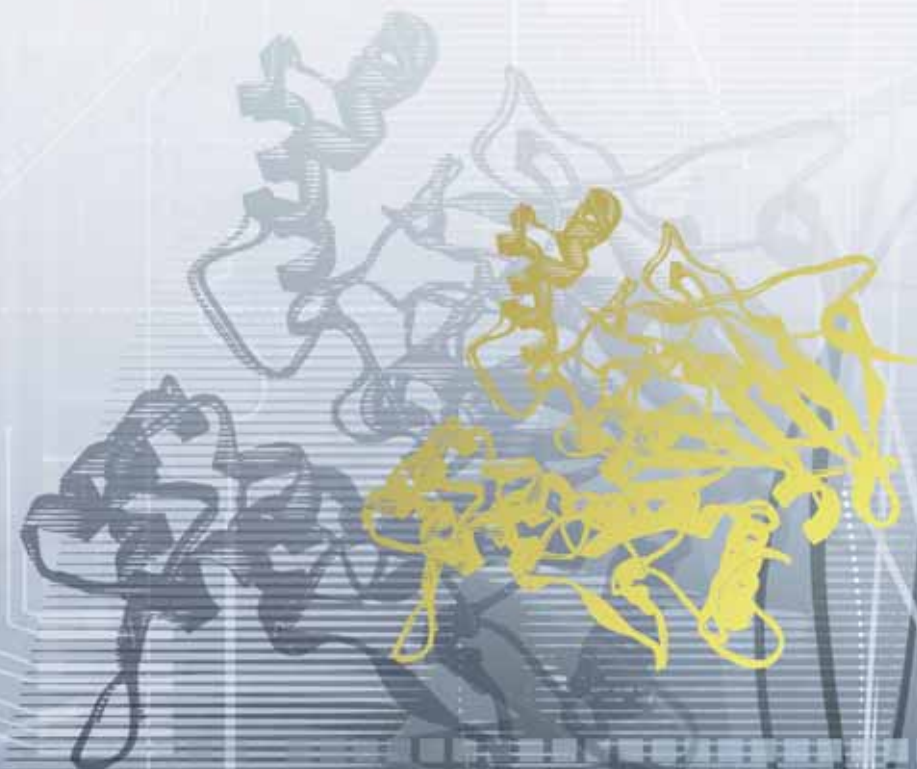
Два простых сомножителя этого числа равны

$p=31711952576901527094851712897404759298051473160294503277847$
 $619278327936427981256542415724309619$

$q=6015260020444561641587641685526676183243543359471811072599$
 $7638280836157040460481625355619404899$

Деятельность по разложению чисел на множители опирается на фундаментальные знания теории чисел и алгебры. Вместе с тем она сочетает в себе черты инженерной науки, поскольку во многом использует допущения, основанные на опыте и все еще не имеющие теоретических обоснований, а с другой стороны, она сродни искусству, так как зачастую продолжительность работы алгоритма и результат зависят от удачного выбора параметров.

Применение суперкомпьютеров для установления механизмов биохимических реакций



10 Применение суперкомпьютеров для установления механизмов биохимических реакций

Развитие высокопроизводительных вычислений позволяет использовать методы квантовой химии для установления механизмов ферментативных реакций и исследования влияния на них направленных мутаций, что необходимо для создания лекарственных средств на основе ферментов с заданными каталитическими свойствами. В статье описывается проект по моделированию реакций гидролиза фосфорорганических соединений в активном сайте бутирилхолинэстеразы и ее модификаций.

АВТОРЫ:

С.В. Луцкекина – мл. науч. сотрудник, Ин-т биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;
e-mail: sofya.lushchekina@gmail.com

P. Masson – Institut de Recherche Biomédicale des Armées–CRSSA, La Tronche–Grenoble, France, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France, University of Nebraska Medical Center, Omaha, USA;

e-mail: pmasson@unmc.edu

F. Nachon – Institut de Recherche Biomédicale des Armées–CRSSA, La Tronche–Grenoble, France;

e-mail: florian@nachon.net

Б.Л. Григоренко – докт. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник, Химический ф-тет МГУ

им. М.В. Ломоносова;

e-mail: bell_grig@yahoo.com

А.В. Немухин – докт. хим. наук, профессор, зав. лаб., Химический ф-тет МГУ им. М.В. Ломоносова, Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;

e-mail: anemukhin@yahoo.com

С.Д. Варфоломеев – чл.-корр. РАН, докт. хим. наук, профессор, директор Ин-та биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, зав. каф. химической энзимологии, Химический ф-тет МГУ им. М.В. Ломоносова;

e-mail: sdvarf@sky.chph.ras.ru

Для эффективного решения задач медицины, фармацевтики и биотехнологии необходимы представления о механизмах реакций ферментативного катализа, что предполагает знание элементарных стадий химических превращений в активных центрах белков. Экспериментальные приемы включают исследования структуры белков и их комплексов с аналогами субстратов с использованием методов рентгеноструктурного анализа и ядерно-магнитного резонанса. Закономерности протекания ферментативных реакций изучаются методами химической кинетики. Существенную поддержку этим исследованиям оказывают методы генной инженерии.

В настоящее время становится возможным проводить анализ элементарных стадий ферментативных реакций и обосновывать механизмы, предлагаемые в экспериментальных исследованиях, с привлечением методов квантовой механики. Ведущую роль в этом процессе играют суперкомпьютерные технологии, их последовательное развитие позволяет включать в расчет все большее число атомов, охватывая целиком макромолекулы, что является критичным для описания реакций ферментативного катализа.

Особо важным представляется применение суперкомпьютеров для моделирования реакций, механизм которых экспериментально недостаточно изучен, и для прогнозирования модификаций с желаемыми терапевтическими свойствами. Ярким примером такого рода задач является задача установления механизма реакций гидролиза в активном сайте холинэстераз и разработка на их основе детоксирующих агентов.

Ацетилхолинэстераза (АХЭ) является одним из ключевых ферментов центральной нервной системы. Его инактивация приводит к тяжелым последствиям, таким, как судороги, паралич и пр., вплоть до летального исхода. Основными агентами, блокирующими работу АХЭ, являются фосфорорганические соединения (ФОС), которые связываются с ней ковалентно и необратимо. Соединения этого типа широко используются в качестве пестицидов, также некоторые из них являются лекарственными и отравляющими веществами, и задача профилактики отравления ФОС стоит в настоящее время достаточно остро.

Бутирилхолинэстераза (БХЭ) является ферментом, близким по структуре к ацетилхолинэстеразе, ее физиологическая роль в организме до конца не ясна. БХЭ также необратимо связывается с ФОС (см. рис. 1), но поскольку это не приводит к заметным последствиям для организма, БХЭ выступает как стехиометрическая ловушка, ковалентно связывая в соотношении 1:1 часть ядовитых молекул ФОС в плазме крови до того, как они достигают нервной системы и находящейся в ней АХЭ.

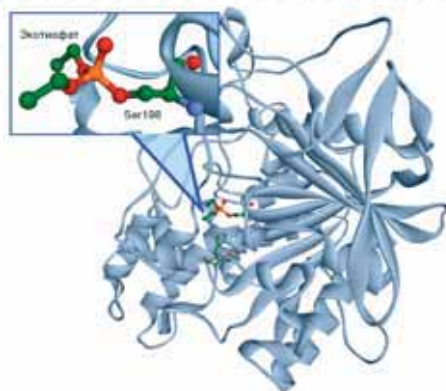


Рис. 1.
Структура бутирилхолинэстеразы, ковалентно связанной с молекулой экотиофата. Выделен конъюгат аминокислотного остатка каталитической триады Ser198 с ингибитором

В связи с этим начато использование нативной БХЭ для профилактики отравлений ФОС. Основным недостатком этого метода заключается в том, что для достижения терапевтического эффекта необходимо введение значительных доз БХЭ, что дорого и затрудняет его использование. Поэтому в настоящее время значительные усилия направлены на разработку каталитических ловушек, способных гидролизовать ФОС достаточно быстро, чтобы доза вводимого препарата была относительно невелика для практического применения.

Одним из направлений таких исследований является поиск модификаций БХЭ, способных к спонтанной реактивации комплекса с ФОС, сопровождающейся его гидролизом. Относительным успехом на этом пути явилось создание модификации Gly117His, способной гидролизовать ряд ФОС, но с довольно низкой скоростью, что не позволяет использовать его в клинической практике. Механизм гидролиза, который обеспечивает мутация Gly117His, до сих пор неизвестен. Объяснение роли этой мутации в гидролизе ФОС является необходимым шагом для создания более эффективных модификаций фермента, способных расщеплять ФОС с более высокой скоростью.

Основным подходом для решения задач такого типа является построение энергетического профиля на поверхности потенциальной энергии для всех этапов реакции гидролиза вдоль координаты реакции — от исходного состояния (в данном случае — ингибированного фермента) через интермедиаты и промежуточные состояния к продуктам реакции — свободному ферменту и фрагментам ФОС. Сравнение энергетических профилей для нативного и модифицированного фермента укажет на природу каталитической активности.

Отправной точкой молекулярного моделирования, во многом определяющей надежность его результатов, является исходная структура биологического объекта. В Институте биомедицинских исследований МО, ЛаТронш—Гренобль, Франция была получена кристаллографическая структура БХЭ с мутацией Gly117His ковалентно связанной с экотиофатом (рис. 1) — препаратом, исполь-



Рис. 2.
Наложение кристаллографических структур нативной (зеленый) и модифицированной (синий) бутирилхолинэстераз

зуемым в офтальмологии для лечения глаукомы [Nachon F. et al., 2011]. Трехмерные координаты атомов белка, введенного аминокислотного остатка His117 и ингибитора описывают структуру комплекса и служат для построения исходной системы для квантово-химических расчетов.

Анализ полученной структуры показывает, что данная мутация не сказывается на конформации белка в целом (рис. 2), поэтому ключевую роль в процессе гидролиза играют изменения в энергетических характеристиках элементарных стадий реакции гидролиза.

В ситуации, когда механизм моделируемой реакции неизвестен, необходимо рассматривать разнообразные варианты прохождения элементарных стадий и выбирать среди них наиболее энергетически выгодные. Помимо изучения различных координат реакций, крайне важно учитывать влияния строения активного центра, которое крайне редко бывает однозначным. В первую очередь, экспериментальные данные как правило не предоставляют информацию о зарядовом состоянии ионогенных аминокислот, таких как гистидин, который имеет два сайта протонирования. При моделировании реакций гидролиза решающее значение имеет аккуратное рассмотрение сети водородных связей и учет различных вариантов ориентации молекулы воды. Кроме того, известно, что в комплексах холинэстераз с ФОС протекают конкурирующие реакции, также требующие рассмотрения и сравнения с предлагаемым механизмом. Это вызывает значительные вычислительные трудности, поскольку установление механизма реакции требует построения многочисленных энергетических профилей, каждый из которых требует серьезных вычислительных затрат. Развитие высокопроизводительных вычислений позволяет рассматривать не только большие биологические системы, но исследовать влияние различных факторов на характеристики реакции. Решение данной конкретной задачи установления механизма гидролиза ФОС модифицированной бутирилхолинэстеразой и выявление факторов, стало возможно благодаря использованию суперкомпьютеров «Чебышев» и «Ломоносов» НИВЦ МГУ.

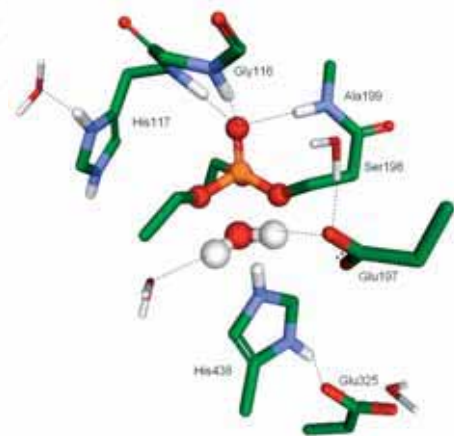


Рис. 3. Активный сайт Gly117His БХЭ в комплексе с экотифатом. Показаны ключевые фрагменты аминокислотных остатков активного сайта. Пунктирными линиями показаны водородные связи

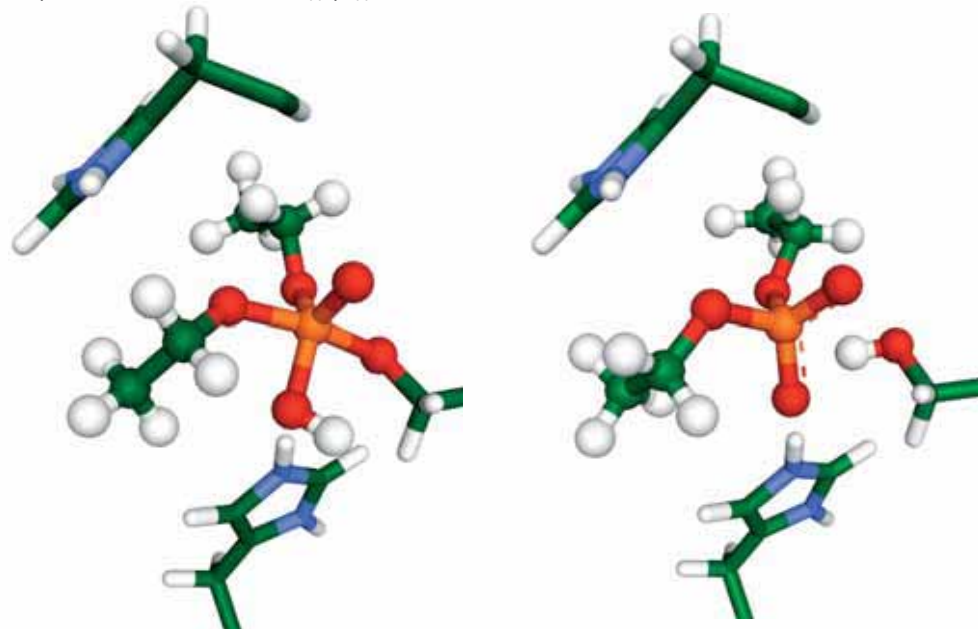


Рис. 4. Интермедиат (слева) и продукты гидролиза (справа)

В ходе работы было установлено, что при протонировании введенного в ходе мутации остатка His117 образующийся положительный заряд на имидазольном кольце стабилизирует интермедиат и отрицательно заряженный продукт гидролиза (рис. 4), существенно снижая энергетический барьер реакции по сравнению с нативным ферментом, и делая возможным гидролиз ФОС. Полученные данные позволяют предложить методы ускорения этой реакции (рис. 5).

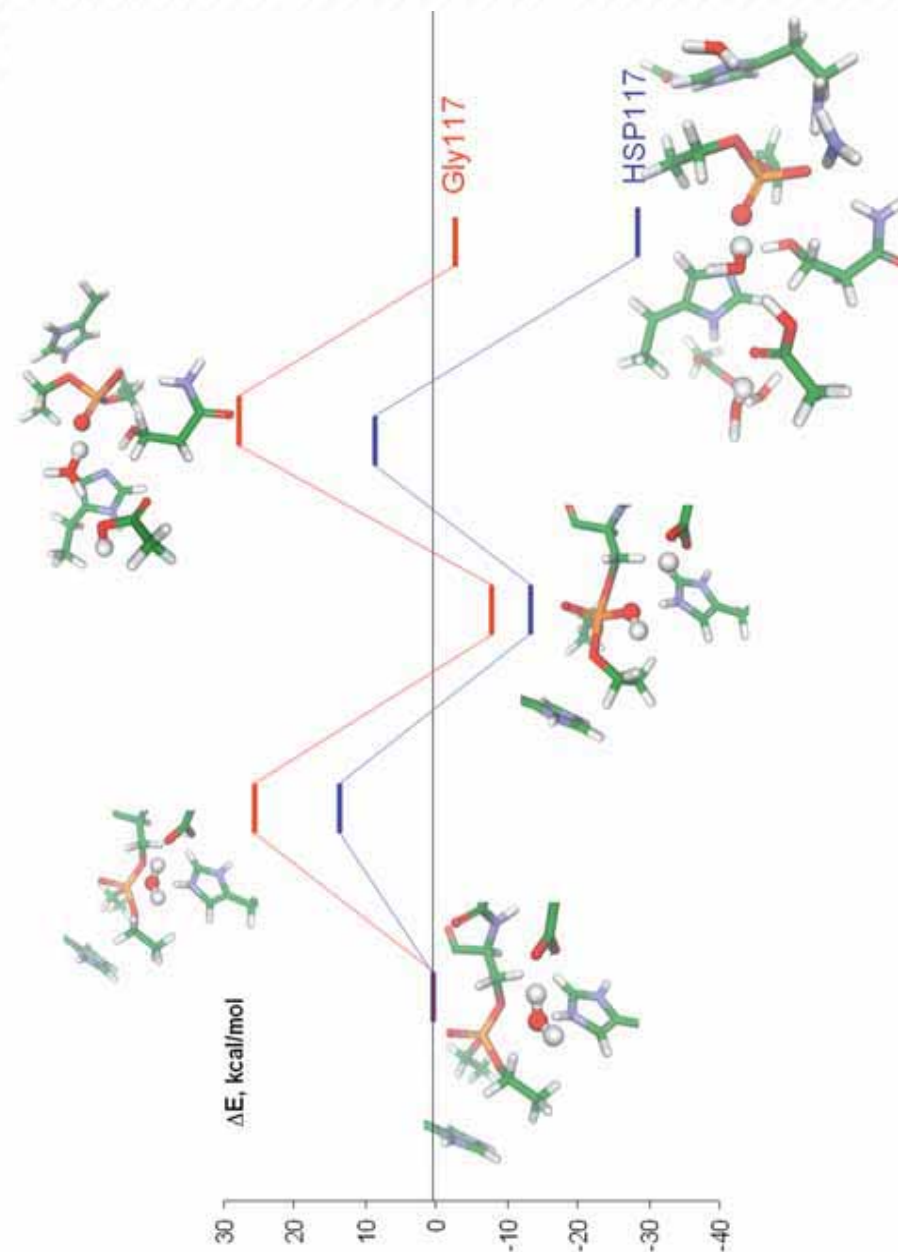


Рис. 5. Энергетические профили реакции гидролиза экотифата нативной БХЭ (показано красным) и ее модификацией Gly117His (показано синим) в варианте протонированного остатка His117

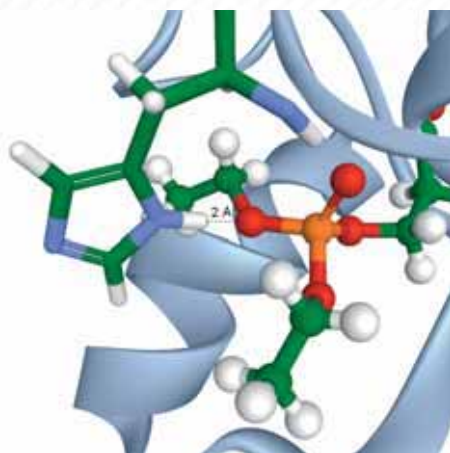


Рис. 6. Конформация активного центра, благоприятствующая образованию водородной связи между His117 и атомом кислорода ингибитора

Предложенный механизм реакции может быть не единственным. Полученная кристаллографическая структура является лишь одной из возможных конформаций белка, в то время как основные группы активного центра могут принимать различные конформации. Методы молекулярной динамики позволяют проследить возможные изменения в конфигурации активного сайта и выделить наиболее вероятные варианты. Так, имидазольное кольцо His117 может менять свою ориентацию в пространстве, и образовывать водородную связь с атомом кислорода ингибитора (рис. 5). При этом основной принцип осуществления каталитического гидролиза ФОС в активном центре

модифицированной БХЭ остается прежним, но это позволяет расширить ряд возможных направленных мутаций для ускорения гидролиза.

Работа выполняется при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 10-03-00085) и Российской академии наук (программа № 9 Отделения химии и наук о материалах РАН).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nachon F. et al. X-ray crystallographic snapshots of reaction intermediates in the G117H mutant of human butyrylcholinesterase, a nerve agent target engineered into a catalytic bioscavenger. *Biochem. J.* 2011, 434(1): pp. 73-82.

Применение параллельных технологий к моделированию динамики и сейсмичности литосферы

