

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ

УДК 538.911

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСНОВ СУБСТРАТНОЙ
СПЕЦИФИЧНОСТИ ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗЫ
ИЗ *THERMUS THERMOPHILUS* МЕТОДАМИ СТРУКТУРНОЙ
БИОИНФОРМАТИКИ© 2023 г. И. Ф. Гарипов^{1,*}, В. И. Тимофеев^{1,2}, Е. А. Заяц³, Ю. А. Абрамчик³, М. А. Костромина³,
И. Д. Константинова³, Р. С. Есипов³¹Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия²Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

*E-mail: ildar.garipov.f@gmail.com

Поступила в редакцию 22.07.2022 г.

После доработки 05.09.2022 г.

Принята к публикации 05.09.2022 г.

Проведено моделирование молекулярной динамики дикой формы белка пурииннуклеозидфосфоори-
лазы с двумя субстратами – аденозином и гуанозином. Проведено аналогичное моделирование бел-
ка мутантной формы с теми же субстратами. Из полученных траекторий методом ММ-GBSA оце-
нено изменение свободной энергии при формировании полученных комплексов.

DOI: 10.31857/S0023476123010101, EDN: GAXNVC

ВВЕДЕНИЕ

Пурииннуклеозидфосфоорилазы (ПНФ) катали-
зируют обратимый фосфорилиз пуриновых рибо-
и 2'-дезоксирибонуклеозидов с образованием
свободного азотистого основания и (дезоксиде-)ри-
боза-1'-фосфата (рис. 1).

Благодаря своей каталитической активности
ПНФ способны в присутствии ионов фосфата
осуществлять реакцию трансгликозилирования:
перенос азотистого основания с одного нуклео-
зида на другой [1–3]. Пурииннуклеозидфосфоори-
лазы играют значительную роль в метаболизме
нуклеиновых кислот и реутилизации пуриновых
азотистых оснований, а также нашли широкое
применение в каскадном синтезе модифициро-
ванных нуклеозидов [17–21].

ПНФ из различных организмов различаются
по ряду параметров: масса, четвертичная структу-
ра и субстратная специфичность, на основе чего
можно выделить два функциональных класса.
Ферменты первого класса ПНФ_I, встречающиеся
у всех живых организмов, представляют собой го-
мотриммеры массой ~90 кДа и узко специфичны в
отношении 6-оксопуриновых нуклеозидов. Фер-
менты второго класса ПНФ_{II}, характерные только
для микроорганизмов, являются гомогексамерами
с молекулярной массой 110–150 кДа и обладают
более широкой специфичностью, взаимодействуя
как с 6-оксопуринами, так и с 6-аминопурина-
ми [3].

Известно, что геном термофильной эубакте-
рии штамма *Thermus thermophilus* HB27 содержит
гены ПНФ как первого, так и второго класса.

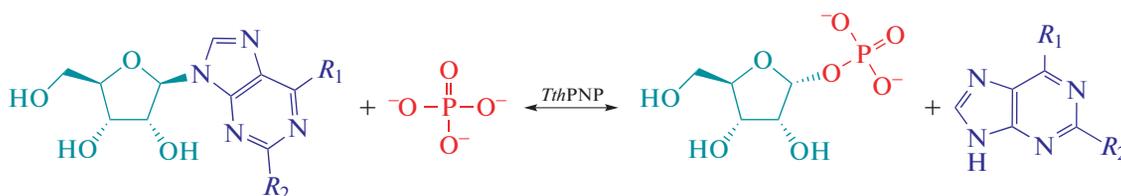


Рис. 1. Схема реакции, катализируемой пурииннуклеозидфосфоорилазой из *Thermus thermophilus* HB27. Аденозин/аде-
нин – $R_1 = \text{NH}_2$, $R_2 = \text{H}$. Гуанозин/гуанин – $R_1 = \text{O}$, $R_2 = \text{NH}_2$.

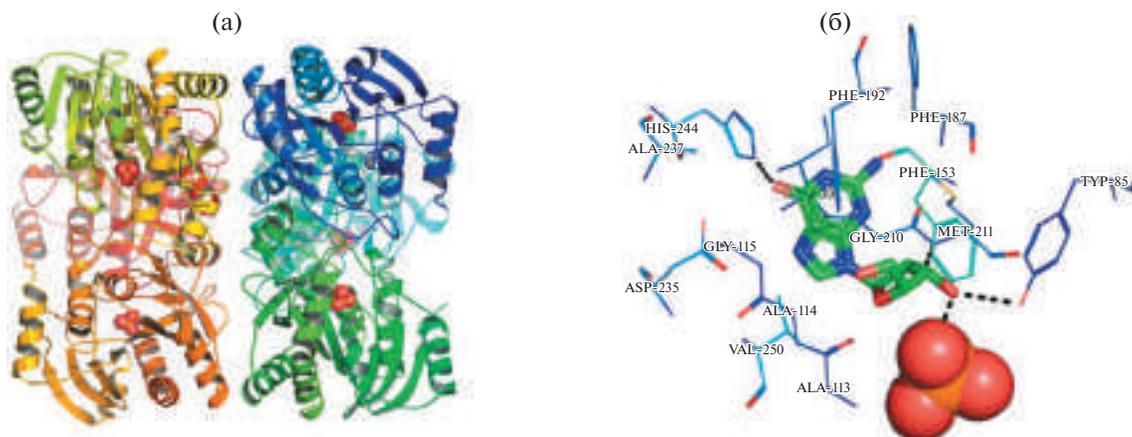


Рис. 2. Пространственная структура гексамера *TthPNPase*, в активных центрах расположен фосфат, изображенный сферами (а). Активный центр *TthPNPase*, светлыми линиями показан Phe153 из полипептидной цепи соседней субъединицы, сферами – фосфат, толстыми стержнями – гуанозин, пунктирными линиями – возможные водородные связи (б).

Объектом данного исследования является пури-нуклеозидфосфорилаза II из *Thermus thermophilus* HB27 (*TthPNPase*). Как представитель второго класса ПНФ, *TthPNPase* является гексамером, способным осуществлять фосфорилиз гуанозина и аденозина [1]. Данный фермент обладает широкой субстратной специфичностью в отношении модифицированных не природных пуриновых азотистых оснований [1]. Субстратами для *TthPNPase* являются не только рибозиды, но и дезоксирибозиды и различные производные 2-дезоксирибозы. Стоит также отметить высокую степень гомологии *TthPNPase* в сравнении с ферментом человека – 40% [1, 3].

Для *TthPNPase* аденозин является значительно лучшим субстратом по K_m и K_{cat} в сравнении с гуанозином, что обусловлено различием заместителя в шестом положении пурина [1]. Сравнительный анализ ПНФ из термофильных бактерий семейства *Deinococcus–Thermus*, проведенный в [2], показал, что определяющую роль в субстратной специфичности *TthPNPase* (в [2] вывод сделан для тримерного ПНФ, гомологичного исследуемому *TthPNPase*) играет аминокислотный остаток Asp235. Аспарат в данном положении обуславливает высокое сродство фермента к аденозину, замена его на аспарагин (мутация D235N) увеличивает активность фермента относительно гуанозина [2].

Для исследования структурных основ субстратной специфичности *TthPNPase* рассмотрим окружение субстрата в активном центре фермента в радиусе до 4 Å от атомов субстрата (рис. 2б): Tyr85, Ala113, Phe187, Phe192, Leu198, Ile209, Gly210, Met211, Thr234, Asp235, Ala237, His244, Val250, а также принадлежащей соседнему мономеру Phe153. Можно видеть, что O6 и N7 атомы гуанозина находятся на расстоянии, достаточном

для формирования водородных связей с атомами Asp235. Аденозин отличается от гуанозина наличием в шестом положении аминогруппы вместо оксогруппы, данная аминогруппа также может образовывать водородные связи с атомами Asp235.

Мутация D235N несколько меняет картину взаимодействий, так как дикарбоновая аминокислота заменяется полярно нейтральной, однако амидогруппа аспарагина ($CONH_2$) также может образовать водородную связь либо с кислородом в положении 6 гуанозина, либо с атомом N7 аденозина [1]. Благодаря полученной в [1] кристаллической структуре белка *TthPNPase* (рис. 2а) представляется возможным провести соответствующие модификации *in silico* и сравнить энергии связывания фермента с аденозином и гуанозином до и после мутации с последующей декомпозицией энергии по аминокислотным остаткам, чему и посвящено данное исследование.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Создание структур комплексов. Для получения необходимого комплекса в программе PyMOL [17] структуру исследуемого белка *TthPNPase* (PDB ID: 6TK9) совместили со структурой гомологичной ПНФ (PDB ID: 3IEX), находящейся в комплексе с гуанозином. Далее с использованием программы PyMOL гуанозин и остаток Asp 235 в белке заменили соответственно на аденозин и Asp. Тем самым сгенерировали четыре необходимые для молекулярной динамики (МД) комплекса дикого и мутантных типов ферментов отдельно с каждым из субстратов.

Моделирование молекулярной динамики. Для предварительной подготовки файлов, моделиро-

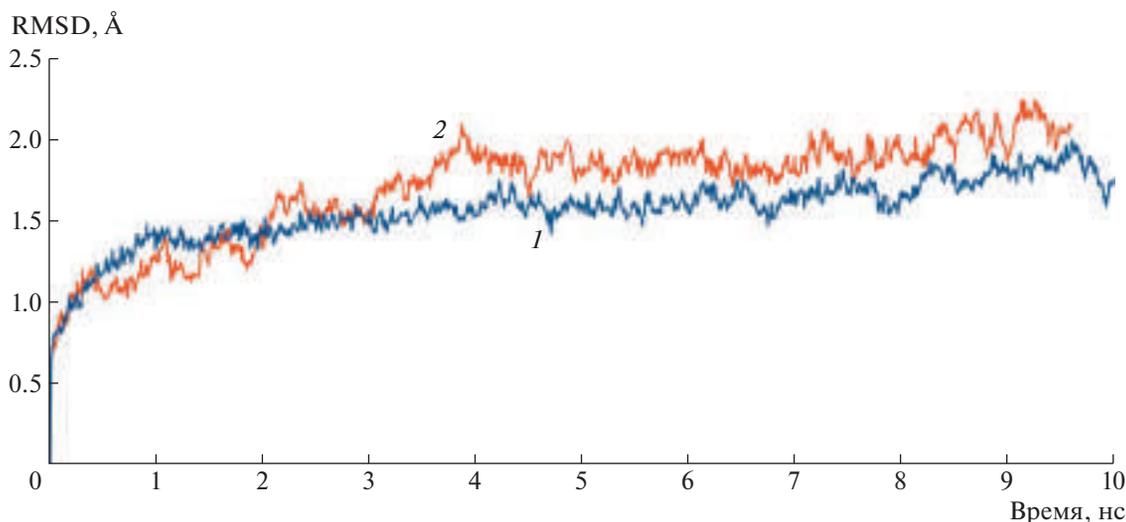


Рис. 3. Графики зависимости среднеквадратичного отклонения (RMSD) атомов от времени для комплексов гуаноина с ферментом дикого (1) и мутантного типа (2).

вания МД и анализа энергий системы использовали пакет программ для МД Amber [4, 5]. Использовали наборы силовых полей ff14SB [6] и GAFF (General AMBER Force Field) [7] для молекул ферментов и лигандов соответственно. Для параметризации лигандов использовали программу antechamber [4]. Для воды использовали модель TIP3P [8]. Молекулу комплекса поместили в кубическую ячейку. Минимальное расстояние от молекулы белка до граней ячейки составляло 1.5 нм. Ячейка была заполнена молекулами воды. В каждую из систем добавили несколько ионов натрия для нейтрализации заряда системы. На первом этапе для каждой из систем провели минимизацию энергии. Далее системы были уравновешены при температуре 300 К и давлении 1 бар путем моделирования динамики в NVT- и NPT-ансамблях (50 пс в каждом) соответственно. Температуру и давление в системах контролировали с использованием модифицированного термостата Ланжевена [9] и баростата Берендсена [10] с временными константами $\tau_T = 1$ пс и $\tau_P = 2$ пс соответственно. Продуктивное 10 нс моделирование МД для каждой из систем проводили в NPT-ансамбле с шагом интегрирования 2 фс. Дальнейшие электростатические взаимодействия рассчитывали с использованием схемы суммирования по Эвальду в варианте PME [7, 11]. Кулоновские потенциалы и потенциалы Леннарда–Джонса были усечены до 1.4 нм, что является наиболее оптимальным для используемого силового поля [5].

Оценка энергии взаимодействия лигандов с белком. Для расчета энергии взаимодействия лигандов с рецептором использовали метод MM-GBSA (Molecular mechanics – Generalized Born surface

area) [12, 13]. Расчет проводили с помощью программы MMPBSA.py [14]. Использовали 1000 фреймов для каждой из систем. Для вычисления энергии взаимодействия использовали модифицированную обобщенную модель Борна, предназначенную для макромолекул [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 3 представлены зависимости RMSD (Root Mean Square Deviation, среднеквадратичное отклонение) от времени для C_{α} -атомов дикого и мутантных форм ферментов в комплексе с гуаноином. RMSD комплекса с нативным ферментом плавно стабилизируется около значения 1.75 Å, тогда как у комплекса мутантного типа плато RMSD устанавливается при значении 2 Å нм и только после 4 нс моделирования. Кривая RMSD комплекса мутантного типа менее плавная и больше в среднем по значению. Из этого можно заключить, что комплекс гуаноина с белком мутантного типа менее стабилен, чем с нативной формой.

Для аденозина кривая RMSD (рис. 4) фермента мутантного типа в отличие от вычислительного эксперимента с гуаноином показывает большую стабильность комплекса с лигандом, достигающая диапазона значений 1.6–1.75 Å. Комплекс нативного фермента с аденозином имеет менее сглаженную кривую и на интервалах времени 1.5–3, 6–7.2 и 8–10 нс значения RMSD заметно больше. Из графика следует, что отклонения атомов полипептидной цепи нативного белка растут на протяжении моделирования, достигая значения 2 Å.

Графики RMSF (Root Mean Square Fluctuation, среднеквадратичная флуктуация) комплексов с

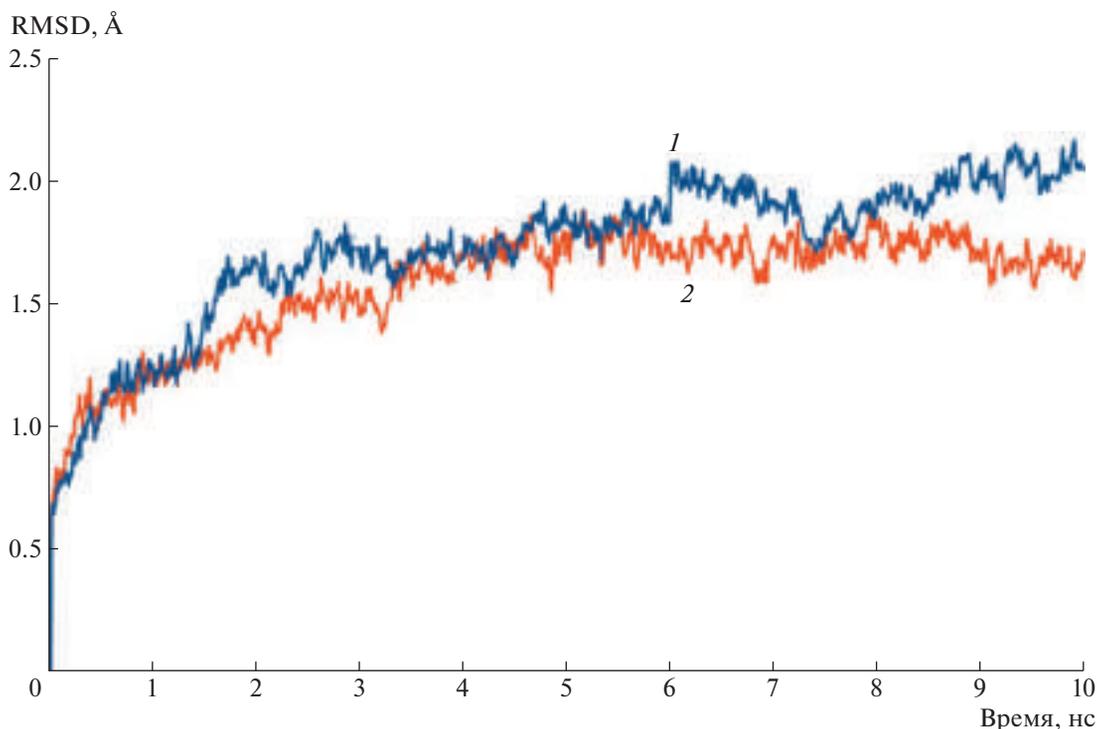


Рис. 4. Графики зависимости среднеквадратичного отклонения (RMSD) атомов от времени для комплексов аденозина с ферментом дикого (1) и мутантного типа (2).

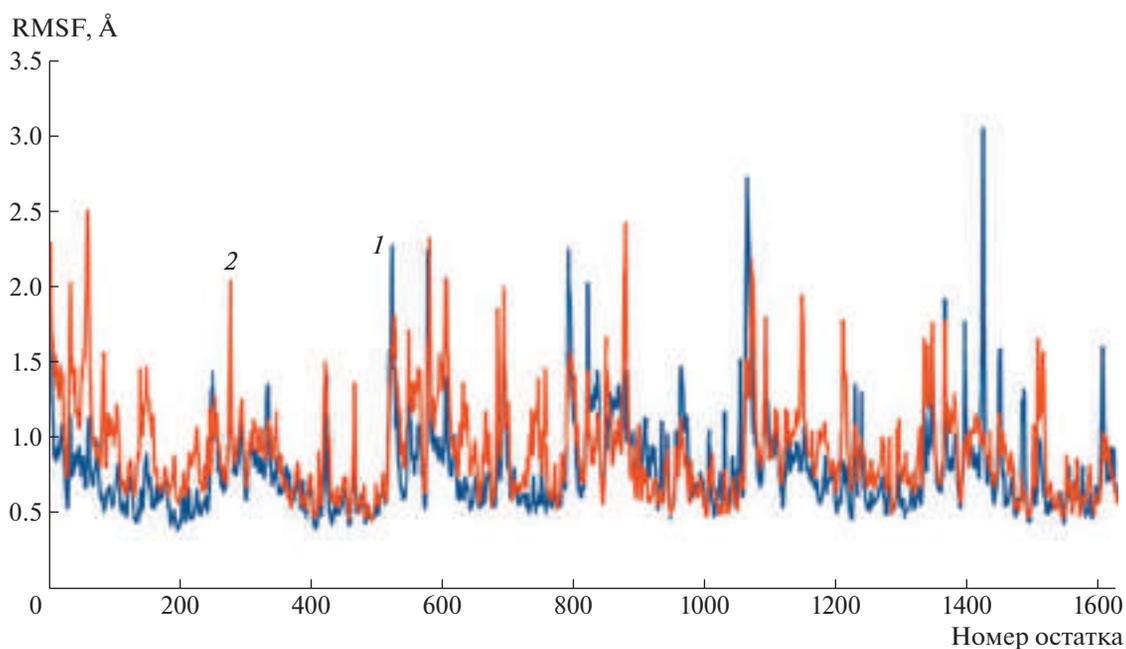


Рис. 5. График флуктуации координат атомов, усредненные по всему времени моделирования (RMSF) комплексов гуанозина с ферментом дикого (1) и мутантного типа (2).

гуанозином (рис. 5) показывают заметные изменения в подвижности участков полипептидной цепи. Для комплекса мутантного типа флуктуации большей части остова белка увеличиваются, что

касается и активного центра, хотя и максимальное значение флуктуаций ~ 3 Å достигается для нативного фермента. Кривые RMSF показывают, что комплекс мутанта с гуанозином в целом стал

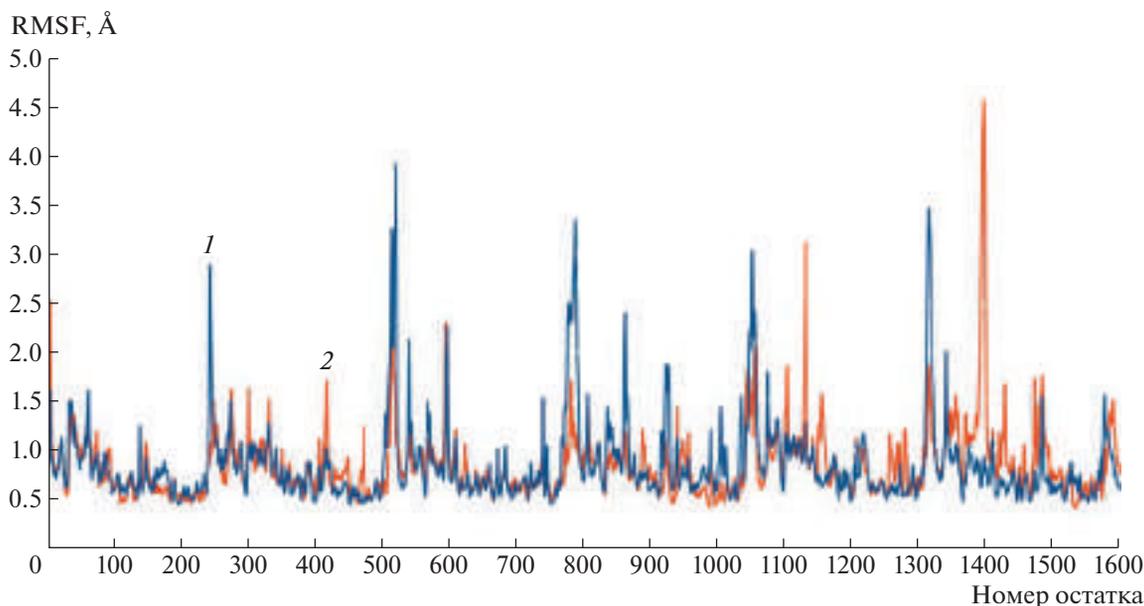


Рис. 6. График флуктуации координат атомов, усредненный по всему времени моделирования (RMSF), комплексов аденозина с ферментом дикого (1) и мутантного типа (2).

более подвижным и пики флуктуаций начали приходиться на другие аминокислоты. Кривая RMSF для комплекса мутантного типа также может свидетельствовать о дестабилизации и влиянии мутации на конформационные превращения, претерпеваемые белком в растворе.

Графики RMSF комплексов с аденозином не сильно разнятся до и после мутации (рис. 6). Заметное различие в кривых RMSF наблюдается на остатках β -листов, расположенных рядом с активными центрами, в которых проводили замену D235N; пиковое значение 4.5 Å приходится на β -листы (остатки 1419–1434) мономера F. Таким образом, существенного изменения в подвижности комплекса с аденозином до и после мутации, судя по кривым, не произошло, по крайней мере картина отличается от результатов с гуанозином. Нельзя не заметить, что первый отличительный пик кривой 1 (рис. 6) приходится на His244, расположенный в активном центре. Этот пик отсутствует у того же аминокислотного остатка гистидина в мутантной форме белка, как и у обоих комплексов с гуанозином, что свидетельствует о его менее фиксированном положении в пространстве. His244, как показано на рис. 2б, способен установить водородную связь с оксогруппой гуанозина, тогда как в связывании аденозина его роль, судя по всему, становится другой либо вовсе утрачивается. Это, в свою очередь, может быть обусловлено изменением распределения частичных зарядов в активном центре после мутации и стерическим различием субстратов.

Также рассмотрено положение субстратов в результате моделирования МД. На рис. 7 постро-

ены кривые RMSD для неводородных атомов гуанозина в комплексе с ферментами дикого (кривая 1) и мутантного типа (кривая 2). Кривая комплекса гуанозина с нативным ферментом заметно флуктуирует до 7 нс с максимальным отклонением 1 Å, что вполне ожидаемо. Интереснее выглядит кривая гуанозина в комплексе с мутантом: первые 5 нс лиганд в обоих случаях имел схожее значение отклонения от начального положения, однако после 5 нс RMSD лиганда резко увеличилось на 1 Å, достигнув более-менее стабильного положения при 2 Å от начального положения.

Аналогичные кривые RMSD для атомов аденозина в комплексе с ферментом показаны на рис. 8. Кривая комплекса с ферментом мутантного типа (кривая 2) выше, чем для комплекса с ферментом дикого типа (кривая 1), почти на всем интервале моделирования (за исключением последней наносекунды), из чего можно заключить, что мутация несколько повлияла на положение субстрата в активном центре, в среднем значения для двух случаев различаются на 0.4 Å. Таким образом, полученные графики свидетельствуют о применимости траекторий для дальнейшего вычисления энергий. Влияние мутации зависит от субстрата. Комплекс ПНФ с аденозином стал более стабильным после замены аспарагиновой кислоты на аспарагин согласно кривой RMSD. В случае комплекса ПНФ с гуанозином замена Asp235 на Asn существенно увеличила подвижность большинства аминокислот (рис. 3) и заметно повлияла на динамику белковой глобулы.

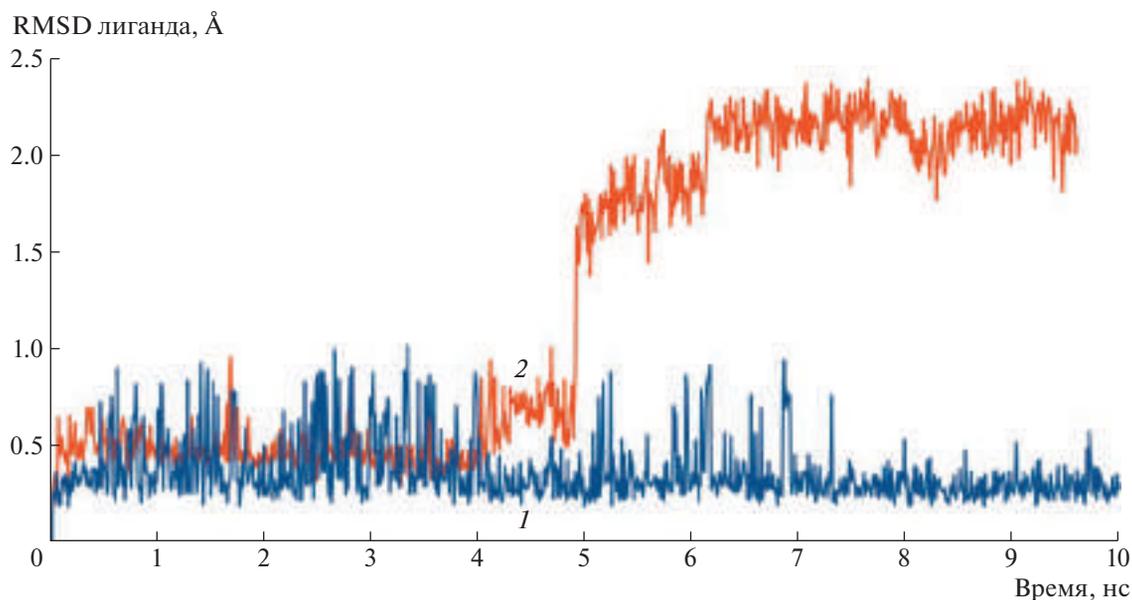


Рис. 7. Подвижность гуанозина в комплексах с ферментом дикого (1) и мутантного типа (2).

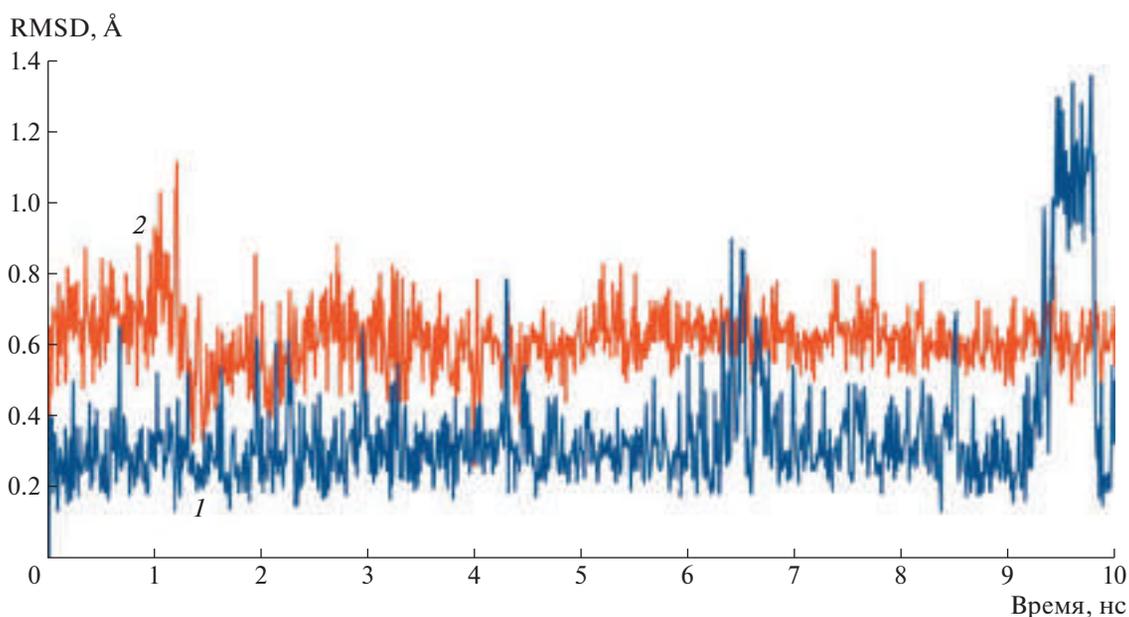


Рис. 8. Подвижность аденозина в комплексах с ферментом дикого (1) и мутантного типа (2).

Методом ММ-GBSA из четырех траекторий рассчитаны энергии связи субстратов с белком в растворе (табл. 1–4).

Из рассчитанных значений следует понижение энергии связи $\Delta\Delta G_{\text{bind}} = -14.3$ ккал/моль для комплекса с гуанозином, тогда как для аденозина произошло изменение в обратную сторону и $\Delta\Delta G_{\text{bind}} = 4.97$ ккал/моль. Так как $\Delta G_{\text{bind}} < 0$ во всех случаях, комплекс с любым субстратом термодинамически выгоден. Изменение энергий

связи в противоположном направлении для аденозина и гуанозина свидетельствует об увеличении специфичности фермента к гуанозину в результате мутации D235N, что согласуется с данными [1, 2].

Проведенный вычислительный эксперимент показал, что мутация D235N сказывается на субстратной специфичности и динамике фермента, причем характер влияния мутации на динамику зависит от природы субстрата: комплекс мутанта

Таблица 1. Изменение компонент свободной энергии при образовании комплекса фермента дикого типа с гуанозином

Компонента свободной энергии	Среднее значение, ккал/моль	Стандартное отклонение, ккал/моль	Ошибка среднего, ккал/моль
ΔE_{vdw}	-34.5	2.95	0.01
ΔE_{el}	-39.49	4.64	0.15
ΔG_{polar}	52.05	2.83	0.08
$\Delta G_{\text{nonpolar}}$	-4.00	0.15	0.01
ΔG_{gas}	-73.99	3.88	0.13
ΔG_{solv}	50.05	2.81	0.09
ΔG_{bind}	-23.95	3.43	0.11

Таблица 2. Изменение компонент свободной энергии при образовании комплекса фермента мутантного типа с гуанозином

Компонента свободной энергии	Среднее значение, ккал/моль	Стандартное отклонение, ккал/моль	Ошибка среднего, ккал/моль
ΔE_{vdw}	-41.24	3.49	0.11
ΔE_{el}	-38.56	9.95	0.32
ΔG_{polar}	46.31	5.33	0.17
$\Delta G_{\text{nonpolar}}$	-4.74	0.15	0.01
ΔG_{gas}	-79.80	9.45	0.31
ΔG_{solv}	41.57	5.27	0.17
ΔG_{bind}	-38.23	5.66	0.19

Таблица 3. Изменение компонент свободной энергии при образовании комплекса фермента дикого типа с аденозином

Компонента свободной энергии	Среднее значение, ккал/моль	Стандартное отклонение, ккал/моль	Ошибка среднего, ккал/моль
ΔE_{vdw}	-25.79	3.25	0.10
ΔE_{el}	-140.93	21.39	0.68
ΔG_{polar}	156.73	20.30	0.64
$\Delta G_{\text{nonpolar}}$	-3.47	0.32	0.01
ΔG_{gas}	-166.72	21.52	0.69
ΔG_{solv}	153.27	20.19	0.64
ΔG_{bind}	-13.45	3.45	0.11

Таблица 4. Изменение компонент свободной энергии при образовании комплекса фермента мутантного типа с аденозином

Компонента свободной энергии	Среднее значение, ккал/моль	Стандартное отклонение, ккал/моль	Ошибка среднего, ккал/моль
ΔE_{vdw}	-34.43	2.43	0.08
ΔE_{el}	-56.19	8.32	0.26
ΔG_{polar}	86.07	8.67	0.27
$\Delta G_{\text{nonpolar}}$	-3.93	0.23	0.01
ΔG_{gas}	-90.62	8.65	0.27
ΔG_{solv}	82.14	8.64	0.27
ΔG_{bind}	-8.48	4.06	0.13

с гуанозином становится более подвижным и менее стабильным, а с аденозином – более устойчивым, с меньшими отклонениями C_{α} -атомов пептидной цепи. *Th*PNPII, в нативной форме специфичная к аденозину и способная расщеплять гуанозин [1], после замены остатка аспарагиновой кислоты на аспарагин начала формировать, согласно результатам расчета методом ММ-PBSA, термодинамически более выгодный комплекс с гуанозином на $\Delta\Delta G_{\text{bind}} = -14.3$ ккал/моль. Для аденозина энергетический выигрыш связи с субстратом наоборот уменьшился на $\Delta\Delta G_{\text{bind}} = 4.97$ ккал/моль.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-13-00429) в рамках расчета МД и при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ “Кристаллография и

фотоника” РАН в части анализа результатов молекулярного моделирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Timofeev V.I., Fateev I.V., Kostromina M.A. et al. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2020. V. 40. P. 1. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1848628>*
2. *Tomoike F., Kuramitsu S., Masui R. // Extremophiles. 2013. V. 17. P. 505. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0535-7>*
3. *Погосян Л.Г., Акопян Ж.И. // Биомедицинская химия. 2013. Т. 59. № 5. С. 483. <https://doi.org/10.18097/pbmc20135905483>*
4. *Salomon-Ferrer R., Case D.A., Walker R.C. // WIREs Comput. Mol. Sci. 2013. V. 3. P. 198. <https://doi.org/10.1002/wcms.1121>*
5. *Case D.A., Cheatham T.E., III, Darden T. et al. // J. Comput. Chem. 2005. V. 26. P. 1668. <https://doi.org/10.1002/jcc.20290>*

6. *Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K. et al.* // J. Chem. Theory Comput. 2015. V. 11. P. 3696. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>
7. *Salomon-Ferrer R., Goetz A.W., Poole D. et al.* // J. Chem. Theory Comput. 2013. V. 9. P. 3878. <https://doi.org/10.1021/ct400314y>
8. *Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D. et al.* // J. Chem. Phys. 1983. V. 79. P. 926. <https://doi.org/10.1063/1.445869>
9. *Allen M.P., Tildesley D.J.* Computer simulation of liquids. New York: Oxford university press, 1991. <https://doi.org/10.2307/2938686>
10. *Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F. et al.* // J. Chem. Phys. 1984. V. 81. P. 3684. <https://doi.org/10.1063/1.448118>
11. *Darden T., York D., Pedersen L.* // J. Chem. Phys. 1993. V. 98. P. 10089. <https://doi.org/10.1063/1.464397>
12. *Kollman P.A., Massova I., Reyes C. et al.* // Acc. Chem. Res. 2000. V. 33. P. 889. <https://doi.org/10.1021/ar000033j>
13. *Srinivasan J., Trevathan M.W., Beroza P. et al.* // Theor. Chem. Acc. 1999. V. 101. P. 426. <https://doi.org/10.1007/s002140050460>
14. *Miller B.R., McGee T.D., Swails J.M. et al.* // J. Chemical Theory and Computation. 2012. V. 8. P. 3314. <https://doi.org/10.1021/ct300418h>
15. *Onufriev A., Bashford D., Case D.A.* // Proteins. 2004. V. 55. P. 383. <https://doi.org/10.1002/prot.20033>
16. *Schrödinger L.L.C.* The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0
17. *Mikhailopulo I.A., Miroshnikov A.I.* // Acta Naturae. 2010. V. 2. P. 36. <https://doi.org/10.32607/20758251-2017-9-2-47-58>
18. *Fateev I.V., Kostromina M.A., Abramchik Y.A. et al.* // Biomolecules. 2021. V. 11. P. 586. <https://doi.org/10.3390/biom11040586>
19. *Roy B., Depaix A., Périgaud C. et al.* // Chem. Rev. 2016. V. 116. P. 7854. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00174>
20. *Almendros M., Berenguer J., Sinisterra J.V.* // Appl. Environmental Microbiology. 2012. V. 78. P. 3128. <https://doi.org/10.1128/AEM.07605-11>
21. *Fateev I.V., Kharitonova M.I., Antonov K.V. et al.* // Chemistry. 2015. V. 21. P. 13401. <https://doi.org/10.1002/chem.201501334>