

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

УДК 575.112

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕДКРИСТАЛЛИЗАЦИОННОГО РАСТВОРА ЛИЗОЦИМА МЕТОДОМ УСКОРЕННОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

© 2023 г. А. С. Ивановский^{2,*}, И. Гарипов², Ю. В. Кордонская^{1,2}, В. И. Тимофеев^{1,2},
М. А. Марченкова^{1,2}, Ю. В. Писаревский^{2,1}, Ю. А. Дьякова¹, М. В. Ковальчук^{1,2}

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника РАН”, Москва, Россия

*E-mail: a. Iwanowski@gmail.com

Поступила в редакцию 20.07.2023 г.

После доработки 17.08.2023 г.

Принята к публикации 17.08.2023 г.

С помощью метода ускоренной молекулярной динамики проведено моделирование поведения димера, выделенного из кристаллической структуры тетрагонального лизоцима. Моделируемое время составило 240 нс. Проведено сравнение полученных данных с данными, полученными ранее с применением классической молекулярной динамики. Показано, что исследуемый димер стабилен в обоих экспериментах, однако метод ускоренной молекулярной динамики позволил выявить дополнительные конформационные изменения молекул лизоцима.

DOI: 10.31857/S0023476123600635, EDN: HJUXNC

ВВЕДЕНИЕ

Белки являются одними из основных макромолекул, участвующих в биологических процессах. Функции белков в живых клетках крайне многообразны. Ферменты являются катализаторами, участвующими в различных биохимических реакциях. Ряд белков имеют транспортную функцию. Один из ярких примеров таких белков — гемоглобин. Некоторые белки имеют, например, сенсорную, двигательную, опорную и другие функции. Такое многообразие функций белков определяется тем, что их трехмерные структуры также весьма многообразны. Этим определяется важность исследования пространственных структур белков, знание их структуры важно как с фундаментальной, так и с практической точки зрения.

Пространственные структуры белков помогают установить механизм их функционирования, а также могут быть использованы для разработки лекарственных средств или создания биокатализаторов с заданными свойствами [1]. Основным экспериментальным способом установления пространственных структур белков является рентгеноструктурный анализ (РСА). Методом РСА установлено ~85% белков, депонированных в банк белковых данных [2]. Основным ограничением этого метода является необходимость получения достаточно совершенного кристалла белка. Несмотря на значительный прогресс последних лет, белковая кристаллизация остается весьма трудоемкой, а также в большей степени эмпирической

и наименее прогнозируемой стадией структурного исследования, направляемой результатами предыдущих попыток. Из-за доступности и простоты кристаллизации лизоцима, выделенного из куриного яйца, он часто используется как модельный объект для исследования механизмов кристаллизации белков [3]. Обнаружено [4], что в предкристаллизационном растворе лизоцима образуются его олигомеры, являющиеся прекурсорами кристаллов белка.

В исследовании процессов кристаллизации белков используется, в том числе, ряд подходов, основанных на молекулярной динамике (МД). Так, в [5, 6] оценивалось изменение свободной энергии при формировании кристаллических контактов и изменении концентрации осадителя. В [7, 8] исследовалась стабильность кристаллов белка в зависимости от концентрации и видов ионов осадителя, а также от зарядов аминокислотных остатков. В ряде работ предпринимались попытки исследования динамики решетки в кристалле белка [9]. Исследовались особенности динамики белка в кристаллическом состоянии по сравнению с раствором [10]. В [11, 12] оценивалась стабильность кластеров-прекурсоров кристаллов лизоцима и протеиназы К.

Несмотря на широкое применение подходов к изучению процессов кристаллизации белков, основанных на МД, данные подходы имеют существенное ограничение: расчет МД для сравнительно больших систем является ресурсоза-

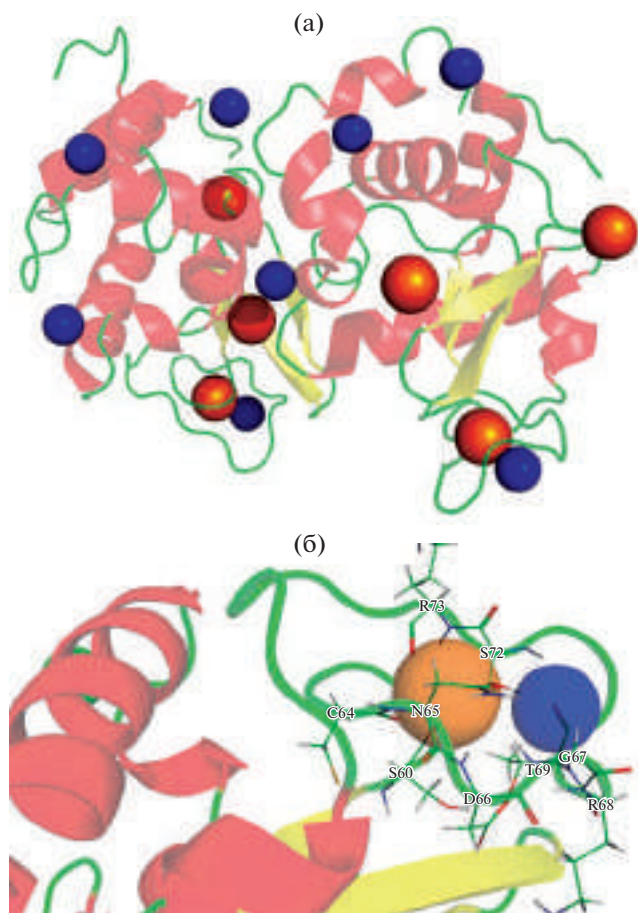


Рис. 1. Димер лизоцима, построенный как описано в [32]. α -спирали изображены красным, бета-листы — желтым, петли — зеленым цветом. Атомы натрия показаны сферами оранжевого цвета, атомы хлора — синего (а). Аминокислотные остатки подвижной петли 60–79 аминокислотного остатка молекулы лизоцима, расположенные на расстоянии не более 4 Å от соответствующих ионов натрия и хлора. Аминокислотные остатки показаны линиями, ион хлора — сферой синего цвета, ион натрия — сферой оранжевого цвета (б).

тратным. Для решения данной проблемы применяются подходы, позволяющие снизить объем расчетов. Одним из таких методов является расчет МД с неявным растворителем [13, 14]. За счет того что при таком подходе молекулы воды не задаются отдельно, объем вычислений существенно снижается.

Еще одним подходом, позволяющим существенно снизить объем вычислений, является так называемое крупнозернистое моделирование МД. Одним из силовых полей, в которых реализован данный метод, является силовое поле MARTINI [15]. Ускорение расчетов происходит за счет упрощения модели: четыре тяжелых атома и связанные с ними атомы водорода представлены одним центром взаимодействия. Данный подход широко используется для систем, содержащих липиды [16–20]. Метод ускоренной МД также

позволяет уменьшить объем расчетов. Ускоренная МД основана на модификации потенциала, введенной в [21]. Данная модификация снижает высоту локальных барьеров, позволяя проводить расчеты намного быстрее. Моделирование конформационных переходов, происходящих в микросекундном масштабе, сравнимо с миллисекундным обычным моделированием МД [22, 23].

В настоящей работе метод ускоренной МД использован для исследования стабильности димера лизоцима из предкристаллизационного раствора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Построение начальной модели димера. Модель димера с четырьмя ионами Cl и тремя ионами Na строили, как описано в [11]. Расчет ионизационных состояний аминокислотных остатков при pH 4.5, что соответствует экспериментальным данным [24], проводили с помощью сервера PROPKA [25].

Расчет ускоренной молекулярной динамики. Подготовку системы для расчета МД проводили с использованием пакета AmberTools20 [25]. В качестве силового поля выбрали поле ff19SB [26], в качестве модели воды — модель TIP3P [28], как наиболее подходящую для использования с силовым полем ff19SB [27]. С использованием tleap из пакета AmberTools20 [25] были заданы дисульфидные связи между следующими парами цистеинов: 6–127, 142–263, 30–115, 166–251, 64–80, 200–216, 76–94, 212–230. В систему было добавлено 0.4 М NaCl, а также 20 ионов Cl для нейтрализации заряда системы. Уравновешивание системы проводили в шесть этапов. На первом минимизировалась энергия только молекул воды. На атомы белка были наложены ограничения подвижности. На втором этапе молекулы воды могли свободно двигаться в стандартных условиях для температуры и давления. На третьем этапе минимизировалась энергия для молекул воды и белка. Четвертый этап представлял собой нагревание системы в NVT-ансамбле с наложенными на атомы белка ограничениями подвижности. Нагревание проводилось от 0 до 293 К. На пятом этапе проводили релаксацию системы в NPT-ансамбле с наложенными на тяжелые атомы белка ограничениями. На шестом ограничения снимались. В качестве термостата использовали термостат Ланжевена [26–28], в качестве баростата — баростат Берендсена [29]. Далее проводили 1 нс МД для вычисления средних потенциальной и торсионной энергий системы для того, чтобы задать необходимые коэффициенты в ускоренной МД. Моделировалось 240 нс с шагом 2 фс.

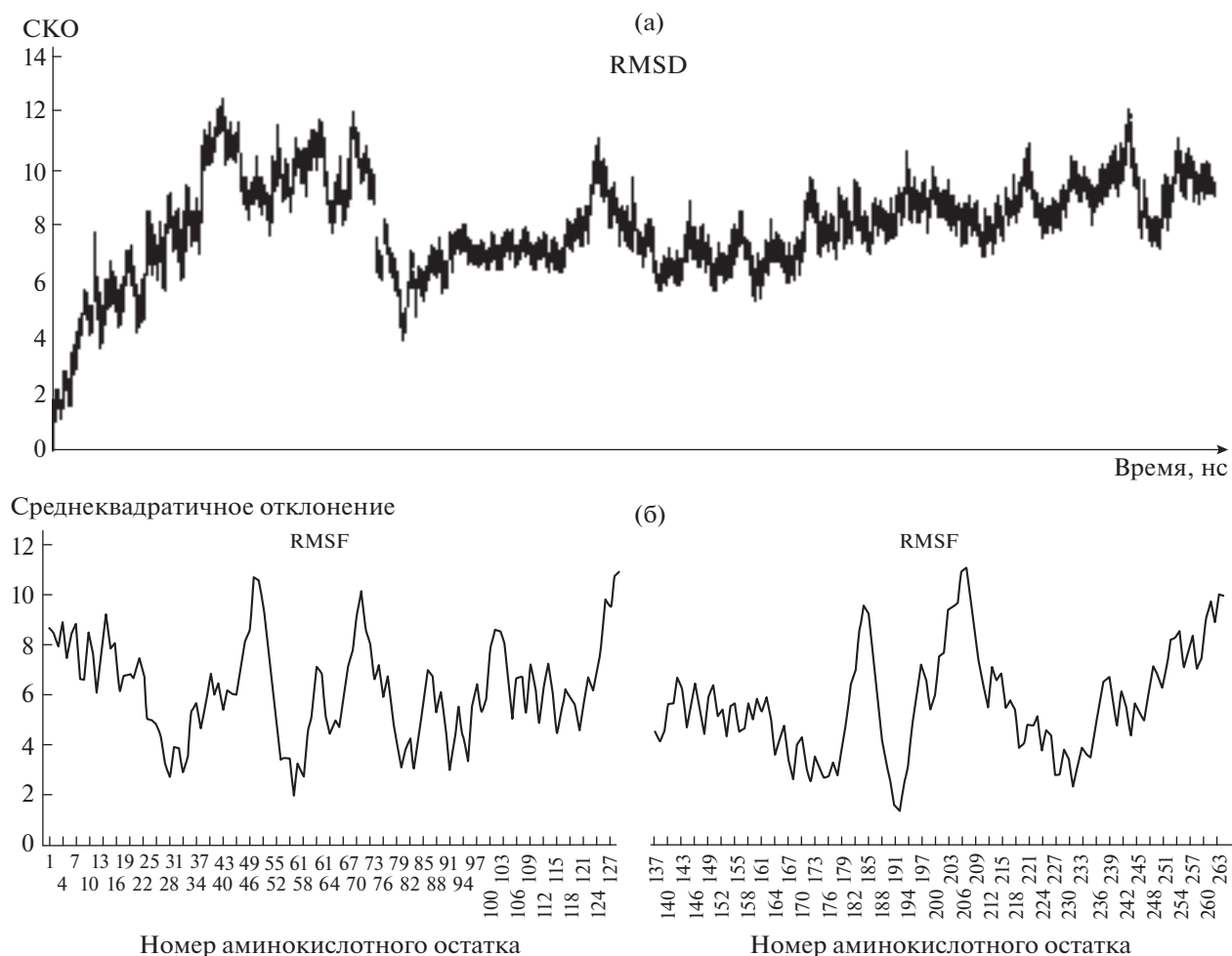


Рис. 2. СКО димера лизоцима (а); СКФ С- α атомов димера лизоцима (б).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемый димер лизоцима, построенный как описано в [11], изображен на рис. 1а. Данный димер содержит восемь ионов хлора и шесть ионов натрия. Отметим, что один из ионов натрия и один из ионов хлора образуют контакты с аминокислотными остатками подвижной петли 60–79 (рис. 1б). Во взаимодействия с ионами вовлечены следующие аминокислотные остатки: S60, C64, N65, D66, G67, R68, T69, S72 и R73. Можно предположить, что данные ионы участвуют в стабилизации петли 60–79 в кристалле.

Для результатов ускоренной МД с коэффициентами $\text{ethreshd}=2446$, $\text{alphad}=206$, $\text{ethreshp}=188640$, $\text{alphap}=8227$ были проанализированы зависимости среднеквадратичных отклонений (СКО) от моделируемого времени и значения среднеквадратичных флуктуаций (СКФ) С- α -атомов димера лизоцима. На рис. 2а представлен график зависимости СКО от моделируемого времени. Из сравнения с ранее полученными с использованием классической МД данными видно, что по харак-

теру обоих графиков исследуемый димер стабилен в 0.4 М растворе NaCl.

На рис. 2б представлен график СКФ С- α -атомов димера лизоцима. Значения, полученные методом ускоренной МД, отличаются от ранее полученных с использованием классической МД [30] прежде всего в районе N-конца. В [31] значения СКФ С- α -атомов для обоих мономеров в составе димера сходны, тогда как значения СКФ С- α -атомов аминокислотных остатков 1–20 различаются в 1.5–2 раза. Кроме того, различия наблюдаются в районе α -спирали 86–101. Такие результаты свидетельствуют о том, что ускоренная МД за счет увеличенного конформационного пространства позволяет более точно моделировать некоторые конформационные изменения белковых молекул, которые предположительно происходят во временном диапазоне порядка микросекунд, и может быть использована для исследования предкристаллизационных растворов белков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод ускоренной молекулярной динамики в применении к моделированию ранее определенного кластера-прекурсора кристаллов тетрагонального лизоцима позволил выявить ряд аспектов поведения данного кластера, не выявленного методом классической молекулярной динамики. Показано, что метод ускоренной молекулярной динамики применим к исследованию механизмов кристаллизации белков.

Работа выполнена в рамках Тематического плана НИОКР НИЦ “Курчатовский институт”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Timofeev V., Samygina V.* // Crystals. 2023. V. 13 (1). P. 71.
<https://doi.org/10.3390/cryst13010071>
2. <https://www.rcsb.org/stats/summary>
3. *Pusey M., Witherow W., Naumann R.* // ScienceDirect. 1988. V. 90. P. 105.
[https://doi.org/10.1016/0022-0248\(88\)90304-1](https://doi.org/10.1016/0022-0248(88)90304-1)
4. *Kovalchuk M.V., Blagov A.E., Dyakova Y.A. et al.* // Cryst. Growth Des. 2016. V. 16. № 4. P. 1792.
<https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b01662>
5. *Aaron Taudt, Axel Arnold, Jurgen Pleiss* // Phys. Rev. E. 2015. V. 91. 033311.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevE.91.033311>
6. *Kordonskaya Y.V., Timofeev V.I., Dyakova Y.A. et al.* // Crystals. 2021. V. 11 (1). P. 1121.
<https://doi.org/10.3390/cryst11091121>
7. *Antonija Kuzmanic, Bojan Zagrovic* // Biophys. J. 2014. V. 106. P. 677.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.12.022>
8. *Cerutti D.S., Trong I., Stenkamp R.E., Lybrand T.P.* // Biochemistry. 2008. V. 47–46. P. 12065.
<https://doi.org/10.1021/bi800894u>
9. *Meinhold L., Merzel F., Smith J.C.* // Phys. Rev. Lett. 2007. V. 99. 138101.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.99.138101>
10. *Cerutti D.S., Trong I., Stenkamp R.E., Lybrand T.P.* // J. Phys. Chem. B. 2009. V. 113. № 19. P. 6971.
<https://doi.org/10.1021/jp9010372>
11. *Kordonskaya Y.V., Marchenkova M.A., Timofeev V.I. et al.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2020 V. 39 (18). P. 7223.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1803138>
12. *Kordonskaya Y.V., Timofeev V.I., Marchenkova M.A., Konarev P.V.* // Crystals. 2022. V. 12. P. 484.
<https://doi.org/10.3390/cryst12040484>
13. *Nguyen H., Maier J., Huang H. et al.* // J. Am. Chem. Soc. 2014. V. 136 (40). P. 13959.
<https://doi.org/10.1021/ja5032776>
14. *Onufriev A.V., Case D.A.* // Annu. Rev. Biophys. 2019. V. 58. P. 275.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118-115325>
15. *Marrink S.J., Risselada H.J., Yefimov S. et al.* // J. Phys. Chem. B. 2007. V. 111. № 27. P. 7812.
<https://doi.org/10.1021/jp071097f>
16. *Sun F., Schroer C.F.E., Palacios C.R. et al.* // PLoS Comput. Biol. 2022. V. 16 (4). E. 1007777.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007777>
17. *Pezeshkian W., Marrink S.J.* // Curr. Opin. Cell Biol. 2021. V. 71. P. 103.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2021.02.009>
18. *Thallmair S., Javanainen M., Fábán B. et al.* // J. Phys. Chem. 2021. V. 125. (33). P. 9537.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c03665>
19. *Frallicciardi J., Melcr J., Siginou P. et al.* // Nat. Commun. 2022. V. 13. P. 1605. <https://www.nature.com/articles/s41467-022-29272-x>
20. *Korotkova P.D., Shumm A.B., Vladimirov Y.A. et al.* // Journal of Surface Investigation: X-Ray, Synchrotron and Neutron Techniques. 2021. V. 15. № 4. P. 652.
21. *Hamelberg D., Mongan J., McCammon J.A.* // J. Chem. Phys. 2004. V. 120 (24). P. 11919.
<https://doi.org/10.1063/1.175565>
22. *Shaw D.E. et al.* // Science. 2010. V. 330. P. 341.
<https://doi.org/10.1126/science.1187409>
23. *Marchenkova M.A. et al.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2020. V. 38. № 17. P. 5159.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1696706>
24. *Dolinsky T.J. et al.* // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. P. W665.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh381>
25. *Case D.A. et al.* // J. Comput. Chem. 2005. V. 26. P. 1668.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20290>
26. *Tian C. et al.* // J. Chem. Theory Comput. 2020. V. 16. P. 528.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00591>
27. *Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D. et al.* // J. Chem. Phys. 1983. V. 79 (2). P. 926.
<https://doi.org/10.1063/1.445869>
28. *Allen M.P., Tildesley D.J.* // Computer simulation of liquids. New York: Oxford university press, 1991.
29. *Hoover W.G., Ladd A.J.C., Phys B.M.* // Phys. Rev. Lett. 1982. V. 48. 1818.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.48.1818>
30. *Evans D.J., Chem J.* // Chem. Phys. 1983. V. 77 (1). P. 63.
[https://doi.org/10.1016/0301-0104\(83\)85065-4](https://doi.org/10.1016/0301-0104(83)85065-4)
31. *Berendsen H.J.C. et al.* // J. Chem. Phys. 1984. V. 81. P. 3684.
<https://doi.org/10.1063/1.448118>
32. *Kordonskaya Y.V., Timofeev V.I., Dyakova Y.A. et al.* // Crystals. 2021. V. 11. P. 1534.
<https://doi.org/10.3390/cryst11121534>