

УДК 544.165

## КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ N-АЦЕТИЛГЛУТАМАТСИНТАЗЫ: ОТ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА ДО ЭЛЕМЕНТАРНЫХ СТАДИЙ КАТАЛИЗА

© 2020 г. И. В. Поляков<sup>1,2,\*</sup>, А. Е. Книга<sup>1</sup>, Б. Л. Григоренко<sup>1,2</sup>,  
А. В. Немухин<sup>1,2</sup>, член-корреспондент РАН С. Д. Варфоломеев<sup>1,2</sup>

Поступило 01.10.2019 г.  
После доработки 11.08.2020 г.  
Принято к публикации 11.08.2020 г.

На основе первичной последовательности аминокислотных остатков N-ацетилглутаматсинтазы построена трехмерная полноатомная модель комплекса фермента с ацетил-КоА и субстратом. Применены биоинформатические подходы компьютерного моделирования, включающие множественное выравнивание последовательностей, предсказание коэволюционных контактов и *ab initio* сворачивание белка. По результатам расчетов методами классической молекулярной динамики и квантовой и молекулярной механики описано строение активного центра и механизм химической реакции, приводящей к образованию N-ацетилглутамата. Согласие структур комплексов фермента с продуктами реакции, полученных при компьютерном моделировании и в рентгеноструктурных исследованиях, подтверждает достоверность предсказаний моделирования.

**Ключевые слова:** N-ацетилглутаматсинтаза, ацетил-КоА, глутамат, моделирование по гомологии, интермедиаты реакций ферментативного катализа

**DOI:** 10.31857/S2686738920060219

Механизм катализируемых N-ацетилтрансферазами реакций переноса ацетильной группы от молекулы ацетилкофермента А (ацетил-КоА) на глутаминовую или аспарагиновую кислоту, приводящих к N-ацетилглутамату или N-ацетиласпартату, не установлен для многих ферментов и является предметом дискуссий. По результатам рентгеноструктурных исследований комплексов ферментов с аналогами субстратов обсуждаются два возможных сценария в активных центрах ацетилтрансфераз – многостадийный механизм по схеме “пинг-понг”, согласно которому на первом этапе ацилируется цистеин белка, а затем ацетильная группа переносится на субстрат [1], и механизм прямого переноса ацильной группы от ацетил-КоА непосредственно на субстрат. Трудности в определении механизма реакции связаны с тем, что не известны экспериментальные струк-

туры комплексов фермента с кофактором и субстратом.

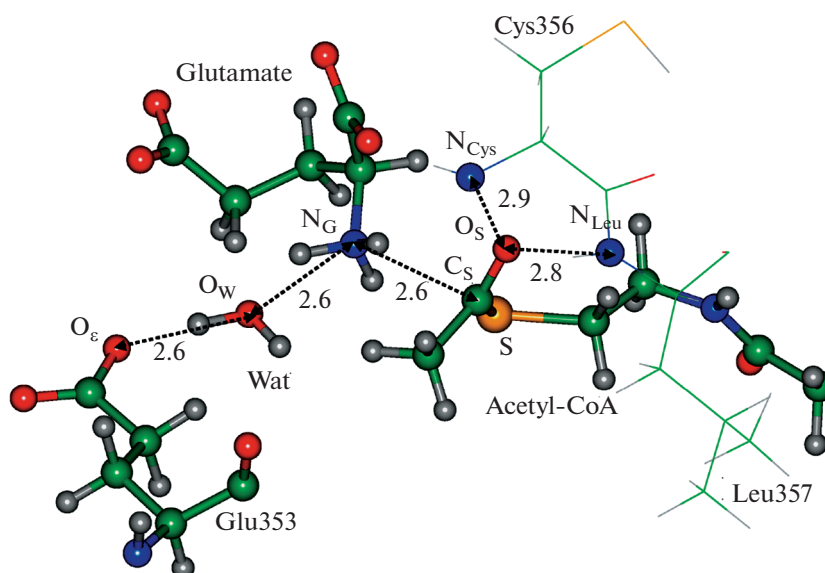
В настоящей работе мы используем современные методы компьютерного моделирования для построения трехмерной полноатомной модели комплекса белка с ацетил-КоА и глутаматом и для оценок энергий интермедиатов химических превращений в активном центре N-ацетилглутаматсинтазы из *Neisseria gonorrhoeae* (ngNAGS). Особенностью нашего подхода является то, что молекулярная модель механизма реакции конструируется на основе первичной последовательности аминокислотных остатков белка [2], а не на основе подходящей кристаллографической структуры. Сравнение результатов компьютерного моделирования с экспериментальными данными проводится для структуры комплекса фермента с продуктами реакции [3] на завершающей стадии исследования. Такой подход, хотя и требует больших усилий, но при успешной реализации достаточно убедителен в отношении надежности предсказаний теории.

На первом этапе мы применили биоинформатические программы для построения трехмерной структуры ngNAGS. Мы использовали процедуру HMMER [4] для сборки порядка 10000 гомологичных последовательностей из баз данных

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: polyakoviv@gmail.com



**Рис. 1.** Фрагмент структуры фермент-субстратного комплекса N-ацетилглутаматсинтазы, предсказанной методами компьютерного моделирования. Расстояния между тяжелыми атомами приведены в Å. В цветном варианте атомы углерода показаны зеленым, кислорода – красным, азота – синим, серы – желтым, водорода – светло-серым.

UniProtKB [2] и программу ClustalO [5] для уточнения множественного выравнивания. Для последующего предсказания коэволюционных контактов аминокислотных остатков была использована программа ResPre [6], реализующая ковариационный анализ в рамках нейросетевой модели. Предсказание вторичной структуры белка проводилось с помощью программы PSSPred ([zhanglab.ccmb.med.umich.edu/PSSPred/](http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/PSSPred/)). Для быстрой генерации структур по предсказанным контактам при интеграции информации о вторичной структуре использовался сервер CONFOLD [7]. Сопоставление лучшей из предсказанных моделей с кристаллической структурой PDB ID 3B8G [3] комплекса ngNAGS с продуктами реакции показало, что среднее квадратичное отклонение по  $C\alpha$  атомам составляет 3.3 Å.

Попарные выравнивания для построения шаблонов были выполнены с помощью процедуры *mapalign* [8]. Кофактор и субстрат были интегрированы в шаблоны с помощью программы RosettaDock. При уточнении моделей по протоколу сравнительного моделирования RosettaCM [9] из списка шаблонов были исключены все известные структуры ngNAGS и их гомологи. Также гомологи данной последовательности были исключены в процессе генерации структурных фрагментов 3-пептидов и 9-пептидов. Были отобраны пять лучших по значению энергетической функции моделей, и после визуального анализа выбрана оптимальная структура для дальнейшего уточнения методами классической молекулярной динамики (МД).

МД траектории длиной 100 нс рассчитывались с помощью программы NAMD [10] в NPT ансамбле при температуре 300 К. Были использованы параметры силового поля CHARMM [11]. При расчетах на  $C\alpha$  атомы белка были наложены ограничивающие гармонические потенциалы, что является стандартной практикой при уточнении моделей после протокола RosettaCM [12]. Расчеты методом квантовой механики/молекулярной механики КМ(РВЕ0-D3/6-31G\*)/ММ(АМВЕР) проводились с помощью программы NWChem [13]. Квантовая часть включала реакционный глутамат, фрагмент молекулы ацетил-КоА, молекулу воды, боковые цепи аминокислотных остатков Glu353, Ser392, Arg316, а также основную цепь Cys356 и Leu357.

Оптимизация геометрических параметров модельной системы методом КМ/ММ позволила впервые получить структуру комплекса N-ацетилглутаматсинтазы со встроенными молекулами ацетил-КоА и глутамата в активном центре фермента. Рисунок 1 иллюстрирует расположение основных участников реакции. Молекула глутамата (glutamate), фрагмент молекулы ацетил-КоА (acetyl-CoA), аминокислотный остаток Glu353 и молекула воды Wat показаны в шаростержневом представлении. Пара аминокислотных остатков Cys356, Leu357, важная для стабилизации тетраэдрического реакционного интермедиата, представлена линиями за исключением атомов азота, показанных шарами.

В работе [3] была высказана гипотеза о механизме реакции синтеза N-ацетилглутамата ферментом ngNAGS – реакция проходит непосред-

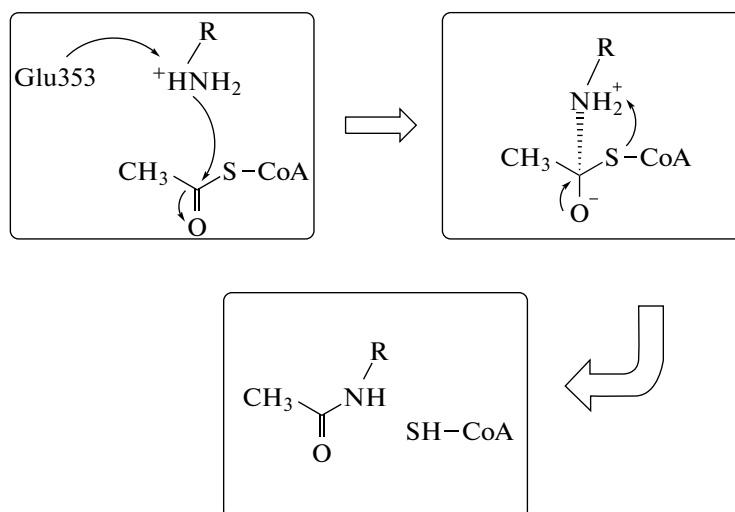


Рис. 2. Механизм реакции синтеза N-ацетилглутамата в активном центре ngNAGS.

ственно между глутаматом и ацетил-КоА, а не в рамках “пинг-понг” механизма, когда ацетильная группа сначала переносится на один из остатков белка. Полученная нами модель подтверждает и уточняет эту гипотезу – в качестве обобщенного основания участвует консервативный остаток Glu533. Действительно, один из трех протонов аминогруппы глутамата может перейти на изначально депротонированную карбоксильную группу Glu533 по ориентированной цепи водородных связей с участием молекулы воды Wat – соответствующие расстояния  $N_G-O_W-O_E$  (2.6 Å, рис. 1) благоприятствуют подобному переносу. Расчеты методом КМ/ММ показывают, что энергия интермедиата, полученного при переносе протона на Glu533, выше энергии фермент-субстратного комплекса примерно на 1 ккал/моль. Короткое расстояние (2.6 Å) между атомом азота  $N_G$  глутамата и атомом углерода  $C_S$  карбонильной группы ацетил-КоА также благоприятствует прямой нуклеофильной атаке с образованием тетраэдрического интермедиата реакции. Аминокислотные остатки Cys356, Leu357 стабилизируют структуру интермедиата – соответствующие расстояния между атомами азота  $N_{Cys}$  и  $N_{Leu}$  и атомом кислорода  $O_S$  карбонильной группы ацетил-КоА, на котором возникает отрицательный заряд, составляют 2.9 и 2.8 Å (рис. 1). Расчеты методом КМ/ММ показывают, что энергия тетраэдрического интермедиата выше энергии фермент-субстратного комплекса на 17 ккал/моль, что допустимо для данной реакции. Разрыв связи  $C_S-S$  координированный с переносом протона на атом серы ацетил-КоА завершает реакцию. По результатам расчетов методом КМ/ММ энергия продуктов на 14 ккал/моль ниже энергии реагентов. Схема реакции представлена на рис. 2.

Структура конечной модельной системы с продуктами реакции, полученная методами компьютерного моделирования, может быть напрямую сопоставлена с экспериментальной кристаллографической структурой PDB ID 3B8G [3]. На рис. 3 показано наложение обеих структур. Среднеквадратичное отклонение по координатам  $C\alpha$  атомов для 144 наложенных аминокислотных остатков составляет 1.12 Å, что является очень хорошим показателем для результатов моделирования по гомологии. Положения боковых цепей важнейших аминокислот в активном сайте, кофермента и N-ацетилглутамата также находятся в хорошем согласии с экспериментальными конформациями. Модельная система воспроизводит ряд важных контактов в активном сайте белка, в частности карбоксильных групп N-ацетилглутамата с боковыми цепями Arg316, Arg425, а также карбонильной группы с основными цепями Cys356 и Leu357. Положение каталитического остатка Glu533 полностью соответствует конфигурации, наблюдаемой в кристаллографической структуре PDB ID 3B8G.

Таким образом, компьютерное моделирование позволило впервые построить комплекс N-ацетилглутаматсинтазы со встроенными молекулами ацетил-КоА и глутамата, проверить одну из гипотез о механизме реакции синтеза N-ацетилглутамата и подтвердить надежность моделирования при сопоставлении полученной модели комплекса фермента с продуктами и экспериментальной структурой белка.

Следует отметить, что задача исследования реакции синтеза родственного соединения N-ацетиласпартата, важной для изучения превращений этого метаболита в мозге человека [14], может быть решена сходными приемами. В отличие от N-ацетилглутаматсинтазы структура N-ацетил-



**Рис. 3.** Наложение кристаллической структуры PDB ID 3B8G и структуры, полученной методами компьютерного моделирования. В цветном варианте: зеленый цвет – кристалл, красный – модель.

аспартатсинтазы плохо описана экспериментально, и при изучении синтеза N-ацетиласпартата остается надеяться на средства молекулярного моделирования.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова, а также суперкомпьютерного центра РАН. Авторы признательны к.ф.-м.н. А.К. Шайтану за полезное обсуждение работы.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке гранта 18-13-00030 Российского научного фонда.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhou X., Ma Z., Dong D., et al. // *British Journal of Pharmacology*. 2013. V. 169. № 4. P. 748–760. <https://doi.org/10.1111/bph.12182>
2. Bateman A., Martin M.-J., Orchard S., et al. // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. № D1. P. D506–D515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>
3. Shi D., Sagar V., Jin Z., et al. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 11. P. 7176–7184. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707678200>
4. Eddy S.R. // *Genome Inform.* 2009. V. 23. № 1. P. 205–211. [https://doi.org/10.1142/9781848165632\\_0019](https://doi.org/10.1142/9781848165632_0019)
5. Sievers F., Higgins D.G. // *Methods Mol. Biol.* 2014. V. 1079. P. 105–116. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7_6)
6. Li Y., Hu J., Zhang C., et al. // *Bioinformatics*. 2019. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz291>
7. Adhikari B., Bhattacharya D., Cao R., et al. // *Proteins Struct. Funct.* 2015. V. 83. № 8. P. 1436–1449. <https://doi.org/10.1002/prot.24829>
8. Ovchinnikov S., Park H., Varghese N., et al. // *Science*. 2017. V. 355. № 6322. P. 294–298. <https://doi.org/10.1126/science.aah4043>
9. Park H., Ovchinnikov S., Kim D.E., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018. V. 115. № 12. P. 3054–3059. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719115115>
10. Phillips J.C., Braun R., Wang W. et al. // *J. Comput. Chem.* 2005. V. 26. № 16. P. 1781–1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>
11. Best R.B., Zhu X., Shim J., et al. // *J. Chem. Theory Comput.* 2012. V. 8. № 9. P. 3257–3273. <https://doi.org/10.1021/ct300400x>
12. Feig M. // *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 2017. V. 7. № 3. P. e1307. <https://doi.org/10.1002/wcms.1307>
13. Valiev M., Bylaska E.J., Govind N., et al. // *Comput. Phys. Commun.* 2010. V. 181. № 9. P. 1477–1489. <https://doi.org/10.1016/j.cpc.2010.04.018>
14. Kots E.D., Khrenova M.G., Nemukhin A.V., et al. // *Russ. Chem. Rev.* 2019. V. 88. № 1. P. 1–26. <https://doi.org/10.1070/RCR4842>

## COMPUTER MODELING OF N-ACETYLGLUTAMATE SYNTHASE: FROM PRIMARY STRUCTURE TO ELEMENTAL STAGES OF CATALYSIS

I. V. Polyakov<sup>a,b,#</sup>, A. E. Kniga<sup>a</sup>, B. L. Grigorenko<sup>a,b</sup>, A. V. Nemukhin<sup>a,b</sup>,  
and Corresponding member of the RAS S. D. Varfolomeev<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup> *e-mail: polyakoviv@gmail.com*

Three-dimensional full-atom model of the enzyme complex with acetyl-CoA and substrate is constructed on the base of the primary sequence of amino acid residues of N-acetyl glutamate synthase. Bioinformatics approaches of computer modeling are applied including multiple sequence alignment, prediction of co-evolutionary contacts and *ab initio* folding. Following the results of calculations by classical molecular dynamics and quantum and molecular mechanics methods, the structure of the active site and reaction mechanism of N-acetylglutamate formation are described. Agreement of the structures of the enzyme-product complexes obtained in computer modeling and those of the X-ray studies validates reliability of modeling predictions.

*Keywords:* N-acetylglutamate synthase, acetyl-CoA, glutamate, homology modeling, reaction intermediates in enzyme catalysis