

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ

УДК 538.911

МОДЕЛИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСА
ФОСФОРИБОЗИЛПИРОФОСФАТСИНТЕТАЗЫ
ИЗ *THERMUS THERMOPHILUS* С АТФ И РИБОЗО-5-ФОСФАТОМ

© 2019 г. Д. Д. Подшивалов^{1,2,3}, Д. Д. Сидоров-Бирюков^{1,2}, В. И. Тимофеев^{1,2,3,*}, А. А. Литунов¹,
М. А. Костромина¹, К. В. Сеницына¹, Т. И. Муравьева¹, И. П. Куранова^{1,2,3}, Р. С. Есипов¹

¹ Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия

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

³ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

* E-mail: tostars@mail.ru

Поступила в редакцию 23.11.2017 г.

После доработки 23.11.2017 г.

Принята к публикации 21.02.2018 г.

Методом молекулярной динамики получено положение субстратов фосфорибозилпирофосфатсинтеазы из *Thermus thermophilus* (АТФ и рибозо-5-фосфата). Показано, что система пришла в равновесие и положения гигантов в активном центре стабильны. На основе полученного комплекса проанализировано окружение субстратов, показаны аминокислотные остатки фермента, имеющие полярные взаимодействия с субстратами. На основании данного анализа получены возможные точки мутагенеза, мутации в которых способны расширить субстратную специфичность фермента по рибозо-5-фосфату.

DOI: 10.1134/S0023476119010211

ВВЕДЕНИЕ

Ферменты семейства фосфорибозилпирофосфатсинтеаз (**PRPP-синтеазы**, КФ 2.7.6.1) катализируют образование 5-фосфорибозилпирофосфата (**5-PRPP**) из аденозинтрифосфата и рибозо-5-фосфата (**P5Ф**) [1]. Продукт катализируемой реакции является промежуточным соединением в ряде важных метаболических процессов, приводящих к синтезу пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, коферментов, а также аминокислот гистидина и триптофана [2–6]. В некоторых бактериях 5-PRPP является субстратом более чем десяти ферментов. Поэтому 5-PRPP является важнейшим клеточным метаболитом, а PRPP-синтеазы относятся к ключевым ферментам, необходимым для жизни организма [7].

Некоторые ферменты, участвующие в нуклеотидном обмене, широко применяются в биотехнологии для химико-ферментативного синтеза аналогов природных нуклеотидов, многие из которых используются как противовирусные и противоопухолевые препараты [8]. Показано, что ферменты нуклеотидного обмена представляют интерес как кандидаты для использования в новой стратегии биосинтеза биологически важных нуклеотидов, так называемом каскадном методе биосинтеза [8]. Новая стратегия состоит в мультиферментном каскадном превращении D-пентоз в пуриновые нуклеотиды с использованием определенных ферментов нуклеинового обмена. Каскадный синтез включает в себя последовательное превращение в “одной колбе” D-пентоз сначала в 5-фосфопентозы под действием рибозкиназы, затем под действием PRPP-синтеазы в 5-фосфо- α -D-пентофуранозо-1-пирофосфаты (5-PRPP); присоединение 5-фосфорибозильной группы к гетероциклическому пуриновому основанию в присутствии аденинфосфорибозилтрансферазы (**APR-трансферазы**) дает конечные нуклеотиды. PRPP-синтеаза катализирует вторую стадию каскада.

Для биотехнологического применения предпочтительны ферменты, имеющие высокий температурный оптимум активности. Таким требованиям отвечают ферменты из термофильных организмов. Не менее важна и субстратная специфичность используемых ферментов. Меньшая степень селективности по отношению к пуриновому основанию и к углеводному субстрату дает возможность расширить круг синтезируемых соединений. Поэтому весьма актуален поиск мутантных форм ферментов, имеющих более широкую специфичность.

Для биотехнологического применения предпочтительны ферменты, имеющие высокий температурный оптимум активности. Таким требованиям отвечают ферменты из термофильных организмов. Не менее важна и субстратная специфичность используемых ферментов. Меньшая степень селективности по отношению к пуриновому основанию и к углеводному субстрату дает возможность расширить круг синтезируемых соединений. Поэтому весьма актуален поиск мутантных форм ферментов, имеющих более широкую специфичность.

Показано, что в геноме бактерии *Thermus thermophilus*, принадлежащей к группе термофилов,

Параметры расчетов

Система в термостате	
Термостат	Модифицированный Berendsen
T, К	330
Система в баростате	
Баростат	Parrinello-Rahman
Давление, атм	1.00
Продолжительность NVT и NPT динамики, пс	100
Молекулярная динамика	
Шаг временной сетки, пс	0.002
Количество шагов	25000000
Интервал времени, нс	50
Частота записи координат, пс	40
Всего кадров траектории	1200
Интегратор	Leap-frog

белки с PRPP-синтетазной активностью кодируются двумя генами [9]. Оба гена были клонированы и экспрессированы, обе PRPP-синтазы, *Th. thermophilus* PRPP-синтазы I и II, выделены и охарактеризованы [9]. Оба фермента несколько различаются по длине полипептидной цепи. PRPP-синтаза I содержит 307, а PRPP-синтаза II 310 аминокислотных остатков, степень сходства между ними достигает 89%. Высокая степень сходства обеих аминокислотных последовательностей с PRPP-синтазой из *E. coli*, более 75%, говорит об их принадлежности к первому классу PRPP-синтаз. Оба фермента имеют максимальную активность при высокой температуре (75 и 85°C) и в этом отношении подходят для биотехнологического применения. В связи с перспективой биотехнологического применения, особый интерес представляет изучение особенностей структуры данных ферментов в комплексе с функциональными лигандами.

Отметим, что для PRPP-синтазы из *Th. thermophilus* имеется пространственная структура фермента в комплексе с аденозиндифосфатом (АДФ) [10], что значительно упрощает построение стартовой модели для молекулярно-динамического эксперимента.

В настоящей работе методом молекулярной динамики получен комплекс PRPP с АТФ и 5-PRPP. На основе полученных данных выбраны аминокислотные остатки, замена которых может привести к изменению субстратной специфичности фермента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения молекулярно-динамических экспериментов в качестве исходной модели использованы координаты PRPPS из *Th. thermophilus* в комплексе с АДФ, взятые из банка данных RCSB PDB (PDB ID:5T3O). Данный комплекс получен в [10] с разрешением в 2.2 Å методом PCA (P5Ф).

Для добавления в систему необходимых лигандов (АТФ и P5Ф) при помощи программы Coot [11] получены координаты АТФ путем наложения его на АДФ. Стартовые координаты P5Ф получены при наложении координат исследуемой структуры на координаты структуры PRPP-синтазы из *Thermoplasma volcanium* в комплексе с P5Ф (PDBID: 3MBI) по Cα-атомам основной цепи. Структура, содержащая P5Ф, получена методом PCA при разрешении в 1.8 Å.

Для моделирования молекулярной динамики атомы белка и лигандов были параметризованы в силовом поле Charmm36 [12]. Построение топологии белка проведено при помощи встроенной в программу GROMACS [13] утилиты pdb2gmx, построение топологии лигандов – при помощи веб-сервиса CharmmGUI [14].

В качестве ячейки для моделируемой системы выбран куб, минимальное расстояние до ребер которого составляло 1 Å. Затем ячейка была заполнена водой типа TIP3P и добавлено 12 ионов Na для компенсации заряда в системе.

Затем была проведена минимизация энергии для релаксации возможных напряжений, возникших при сольватации. После минимизации энергии на атомы системы были наложены ограничения и установлены давление в 1 атмосферу и температура в 330 К. После установления всех необходимых параметров ограничения были сняты и проведен молекулярно-динамический эксперимент, в результате которого получены траектории движения всех атомов системы на временном интервале в 50 нс. Протокол молекулярной динамики описан в таблице.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученная траектория проанализирована при помощи наложения атомов углерода основной цепи системы на их исходное положение и построен график среднеквадратичного отклонения молекулы белка и лигандов от своего положения (рис. 1). Полученные данные показывают, что система пришла в состояние равновесия.

Положение лигандов уточнено методом молекулярной динамики. После симуляции молекулярной динамики получены и проанализированы траектории движения атомов системы. Определены аминокислотные остатки, участвующие в связывании лигандов в активном центре HisB-Mt. Данные об окружении каждого из лигандов полу-

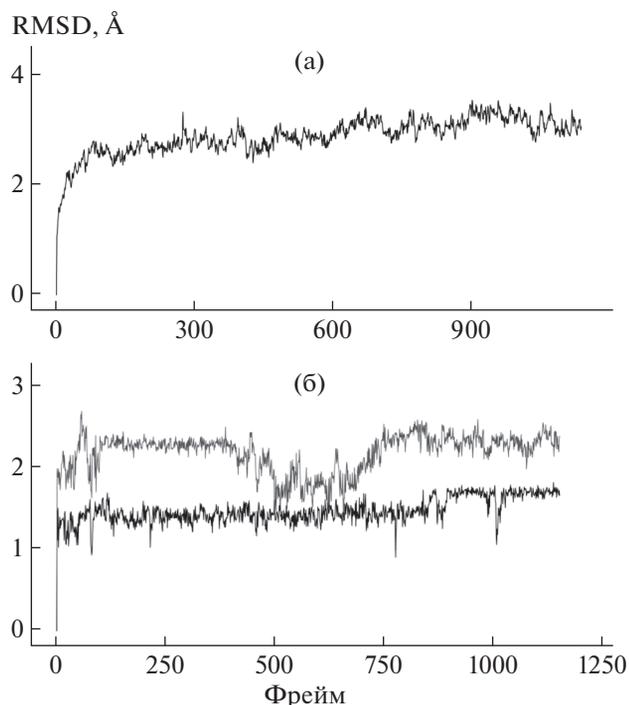


Рис. 1. Среднеквадратичное отклонение положений атомов белка (а), АТФ и 5-рибозофосфата (б).

чены и проанализированы с помощью программы LigPlot.

Окружение R5P представлено на рис. 2. Фосфат образует водородные связи с карбоксильной

группой Asp220 и Ala226, Ser228, Leu229. Аминокислотные остатки Ser228 и Gly227 связаны с атомом кислорода углеводного цикла. Гидроксильная группа C1 атома цикла образует водородные связи с атомами азота и кислорода гидроксильной группы Thr225 и атомами азота Ala226 и Gly227.

На рис. 3 показано, что АТФ образует водородные связи с белковыми цепями В и F, а также с R5P. Первые выражены связыванием трифосфата с аминокислотными остатками Arg196 и Lys100 цепи В и Arg183 и Lys176 цепи F. С R5P связывание осуществляется посредством образования водородной связи между гидроксильной группой C₃-рибозы и NH₂-группой аденозина.

Временная модель комплекса PRPPS + R5P + АТФ проанализирована с использованием программ VMD и GROMACS. Лиганды имеют стабильное положение в активном центре фермента, следовательно, модель может позволить судить об окружении лигандов. Далее с использованием программ VMD и GROMACS был получен файл с координатами модели на второй наносекунде молекулярно-динамической траектории. Файл преобразован в формат .pdb и проанализирован с использованием программы PyMol. За положение рибозного кольца R5P могут отвечать боковые группы аминокислотных остатков Ser-228 и Thr225 как наиболее близких к нему. Следующим этапом работы предполагается эксперименталь-

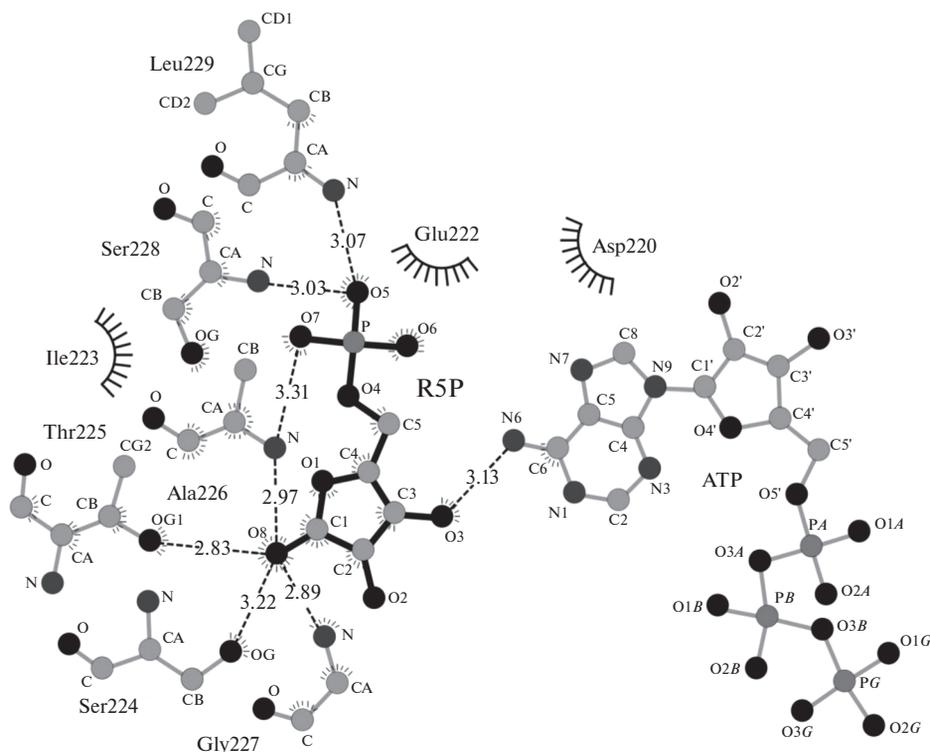


Рис. 2. Окружение рибозо-5-фосфата в активном центре PRPP-синтетазы.

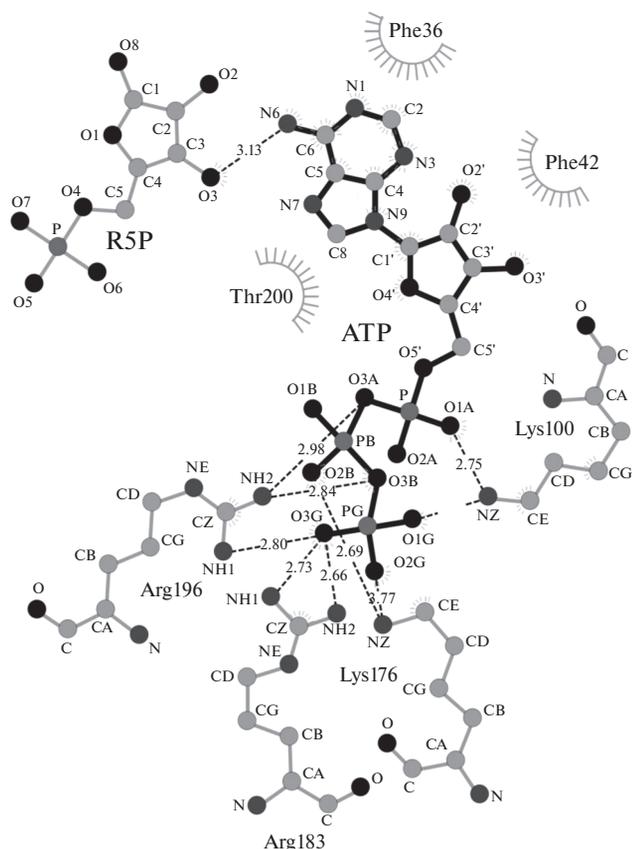


Рис. 3. Окружение АТФ в активном центре PRPP-синтетазы.

но проверить следующие мутанты: Ser228-Ala и Thr225-Ala, чтобы определить влияние данных аминокислотных остатков на активность и специфичность фермента.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00131) в части молекулярного моделирования и Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН в части анализа данных молекулярного моделирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Khorana H.G., Fernandes J.F., Kornberg A.* // J. Biol. Chem. 1958. V. 230. P. 941.
2. *Switzer R.L.* // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. P. 2854.
3. *Becker M.A., Raivio K.O., Bakay B. et al.* // J. Clin. Invest. 1980. V. 65. P. 109.
4. *Hove-Jensen B., Nygaard P.* // Eur. J. Biochem. 1982. V. 126. P. 327.
5. *Hove-Jensen B.* // Mol. Microbiol. 1983. V. 3. P. 1487.
6. *Hove-Jensen B.* // J. Bacteriol. 1988. V. 170. P. 1148.
7. *Eriksen T.A., Kadziola A., Bentsen A.K. et al.* // Nat. Struct. Biol. 2000. V. 7. P. 303.
8. *Mikhailopulo A.I., Miroshnikov A.I.* // Acta Nature. 2010. V. 10. P. 36.
9. *Cherney M.M., Cherney L.T., Garen C.R. et al.* // J. Mol. Biol. 2011. V. 413. P. 844.
10. *Timofeev V.I., Sinitsyna E.V., Kostromina M.A. et al.* // Acta Cryst. F. 2017. V. 73. P. 369.
11. *Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G. et al.* // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 486.
12. *Huang J., Rauscher S., Nawrocki G. et al.* // Nature Methods. 2016. V. 14. P. 71.
13. *Hess B., Kutzner C., van der Spoel D. et al.* // Chem. Theory Comput. 2008 V. 4. P. 435.
14. *Jo S., Kim T., Iyer V.G. et al.* // J. Comput. Chem. 2008. V. 29. P. 1859.