

УДК 538.911

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПОКСИГЕНАЗЫ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КВАНТОВОЙ МЕХАНИКИ

© 2022 г. А. А. Юрченко<sup>а, \*</sup>, П. Д. Короткова<sup>б, \*\*</sup>, В. И. Тимофеев<sup>с, d</sup>,  
А. Б. Шумм<sup>б, e</sup>, Ю. А. Владимиров<sup>а, b, c</sup>

<sup>а</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет  
им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения РФ, Москва, 117997 Россия

<sup>б</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
Москва, 119991 Россия

<sup>с</sup>Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН,  
Москва, 119333 Россия

<sup>d</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”,  
Москва, 123182 Россия

<sup>e</sup>Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: yurchekoanastasiaaa@yandex.ru

\*\*e-mail: korotkovapol@gmail.com

Поступила в редакцию 18.01.2022 г.

После доработки 28.03.2022 г.

Принята к публикации 28.03.2022 г.

Липоксигеназы являются классом ферментов, которые катализируют реакцию диоксигенации полиненасыщенных жирных кислот. Запуская перикисное окисление липидов, липоксигеназы могут принимать участие в процессе ферроптоза, который ассоциирован с рядом патологических состояний, в частности с некоторыми заболеваниями нервной системы. Липоксигеназы представляют собой железосодержащие белки, в которых ион железа расположен в активном центре фермента и необходим для катализа. С использованием комбинированного метода квантовой и молекулярной механики получена модель металлсодержащего сайта липоксигеназы LOX-15. При помощи метода молекулярной динамики и анализа координационных связей иона железа активного центра фермента показано, что такая модель более стабильна по сравнению со стандартной молекулярно-механической моделью и больше подходит для изучения механизма функционирования фермента.

**Ключевые слова:** липоксигеназа, ферроптоз, молекулярная динамика.

**DOI:** 10.31857/S1028096022120330

### ВВЕДЕНИЕ

Липоксигеназы – это класс ферментов, катализирующих реакцию диоксигенации полиненасыщенных жирных кислот. Липоксигеназы являются железосодержащими белками, в которых ион железа расположен в активном центре фермента и необходим для катализа [1]. Липоксигеназы обнаружены у животных, растений и грибов [1]. Несмотря на такую широкую распространенность, функции липоксигеназ в живой клетке и механизм липоксигеназной реакции изучены не до конца [2, 3]. Тем не менее считают, что липоксигеназы человека принимают участие в процессе ферроптоза – программируемой гибели клеток, когда происходит зависимое от железа перекисное окисление липидов [4, 5]. Также считают, что с ферроптозом ассоциирован ряд патологических состояний, например, некоторые болезни мозга, в том числе болезни Паркинсона и Альцгеймера [6–8]. Таким образом, изучение

процесса ферроптоза является значимой научной задачей. Известна пространственная структура липоксигеназы человека LOX-15 [9]. Она состоит из двух доменов – малого b-домена и большого a-спирального каталитического домена. Липоксигеназа человека – это мембранно-ассоциированный белок. Предположительно, он выполняет свою роль в комплексе с белком-партнером [9]. Исследование функций такой системы экспериментальными методами представляет собой чрезвычайно сложную задачу. Однако возможно использовать для исследования свойств и функций такого комплекса методы вычислительной биологии. Например, применяя метод молекулярного докинга и молекулярной динамики, можно построить модель исследуемой системы и изучить ее структуру и динамические свойства. С помощью комбинированного метода квантовой и молекулярной механики можно промоделировать катализируемую ферментом реакцию, детально изу-

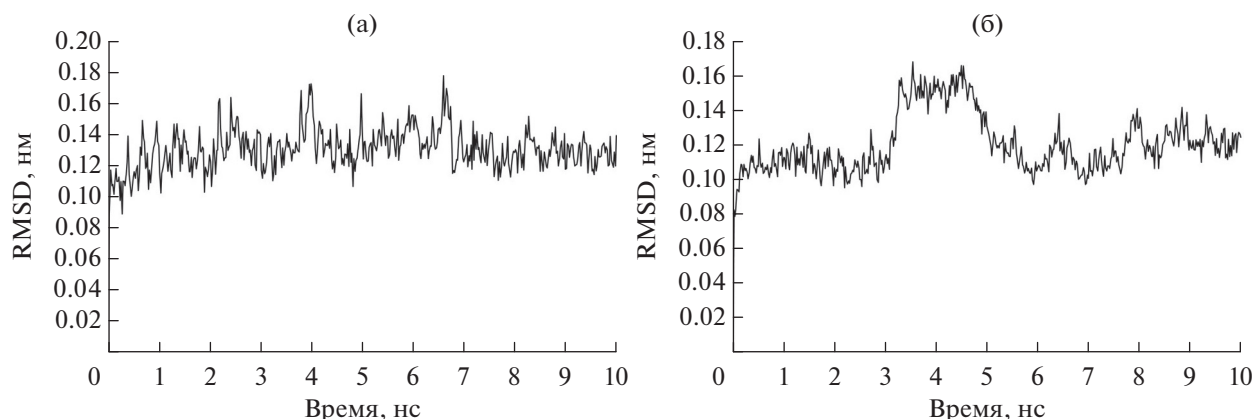


Рис. 1. Среднеквадратичное отклонение RMSD для классической (а) и гибридной (б) систем.

чив таким образом механизм катализа [10]. Однако для металлсодержащих ферментов обычно требуется предварительное построение модели металлсодержащего сайта [11]. Такая модель может быть построена с использованием методов квантовой химии [11]. В настоящей работе была получена модель квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ) активного сайта липоксигеназы LOX-15. Методом молекулярной динамики показано, что такая модель более стабильна и больше подходит для изучения механизма функционирования фермента.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Построение модели

Для построения модели КМ/ММ металлсодержащего сайта человеческой липоксигеназы LOX-15 (PDBID:4NRE) применен подход, реализованный в MSCPВ.py (4-(4-chloro-2-methylphenoxu) butanoic acid) [12]. На первом этапе были подготовлены файлы для дальнейшей квантово-механической оптимизации. Для этого был использован интернет-сервис H++ [13]. Для подготовки иона железа применяли программу metalpdb2mol2.py из программного пакета AmberTools19 [14]. После подготовки файлы объединяли и затем с помощью программы pdb4amber [14] получали файл необходимого формата. На следующем этапе была проведена подготовка входных параметров для квантово-механической оптимизации с помощью MSCPВ.py [12]. Квантово-механическую оптимизацию модели проводили с использованием программного пакета GAMESS-US [15]. Расчет осуществляли в приближении V3LYP [16] подхода Кона–Шэма [17], основанном на гибридном функционале, в рамках теории функционала плотности [18]. Параметры силового поля для Amber [19] генерировали с помощью MSCPВ.py [12] и tleap [14].

### Молекулярная динамика

Моделирование методом молекулярной динамики проводили с помощью программы Amber 18 [19]. В качестве силового поля было выбрано поле ff14SB [20]. В качестве модели воды брали модель TIP3P как наиболее подходящую для использования с силовым полем ff14SB. В систему было добавлено 0.15 М KCl, а также несколько ионов  $K^+$  и  $Cl^-$  для нейтрализации заряда системы. Для релаксации структуры и во избежание стерических клэшей была минимизирована потенциальная энергия. Давление и температура в системе были уравновешены до 1 атм и 310 К путем запуска моделирования с ограничениями в ансамблях *NVT* и *NPT*. Давление и температуру в системе контролировали с помощью термостата Берендсена [21] и баростата Паринелло–Рахмана [22]. Продуктивную симуляцию молекулярной динамики в течение 5 нс для каждой из систем проводили в изотермо-изобарическом ансамбле с шагом 2 фс. Ван-дер-ваальсовы и кулоновские взаимодействия были усечены до 1.4 нм, что оптимально для используемого силового поля [20].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве начального анализа траекторий были рассчитаны среднеквадратичное отклонение RMSD (root-mean-square deviation), радиус гирации  $R_g$  и среднеквадратичные флуктуации RMSF (root-mean-square fluctuations) для каждой из моделируемых систем. На рис. 1 показаны графики среднеквадратичных отклонений для классической и гибридной системы. Видно, что отклонения находятся в диапазоне 0.1–0.18 нм, что с учетом их размера говорит о стабильности моделируемых систем. На рис. 2 представлены графики радиуса инерции для каждой из систем. Из рисунка видно, что компактность систем существенно не меняется в процессе моделирования. На рис. 3 показаны среднеквадратичные флуктуации для атомов C- $\alpha$  каждой из систем. Из рисунка

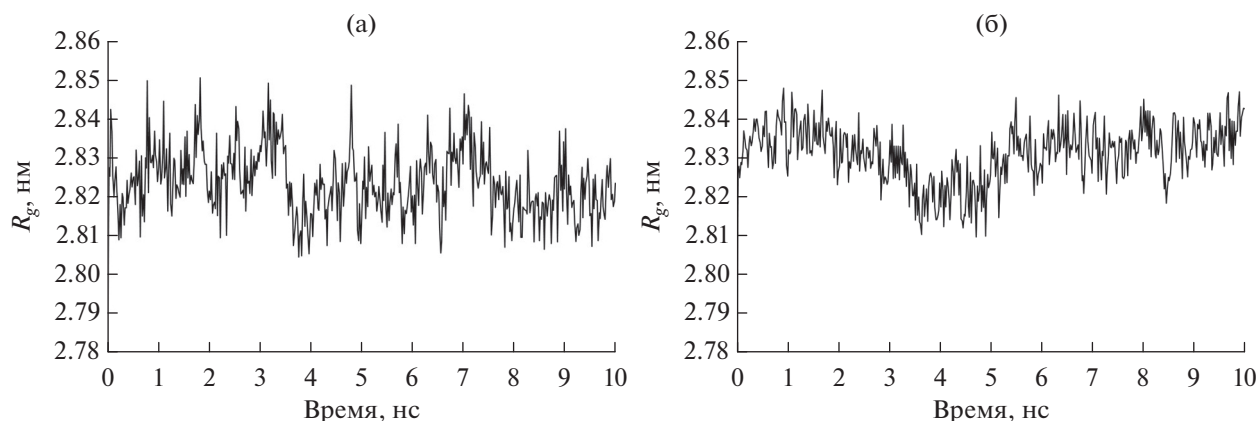


Рис. 2. Радиус гирации  $R_g$  для классической (а) и гибридной (б) систем.

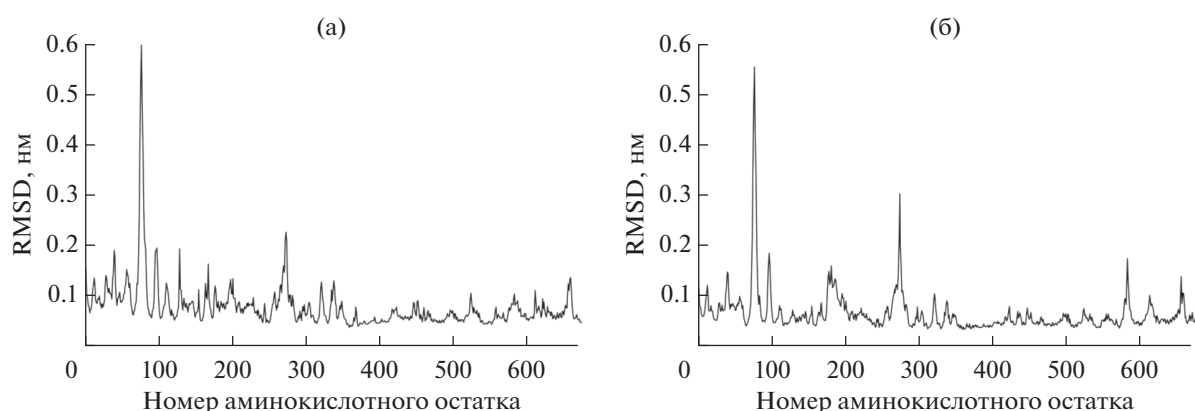


Рис. 3. Среднеквадратичные флуктуации RMSF для классической (а) и гибридной (б) систем.

ка видно, что в районе 80–90 остатков имеется подвижный участок.

Известно, что ион железа в молекуле липоксигеназы LOX-15 координируют три остатка гистидина: His378, His373 и His553 [9] (рис. 4). Поэтому для квантово-механической оптимизации были выбраны эти три аминокислотных остатка и ион железа. Примененный подход Кона–Шэма (B3LYP) представляет собой гибридный функционал, основанный на сочетании метода Хартри–Фока и теории функционала плотности с использованием обменно-корреляционного потенциала Беке–Ли–Янга–Парра [23, 24]. Данный подход наиболее распространен при решении задач в области квантовой химии применительно к макромолекулам, он дает высокую точность расчетов и предъявляет относительно низкие требования к вычислительным мощностям [25]. В результате расчетов были получены параметры силового поля для иона железа и координирующих его остатков. Для проверки полученной модели с помощью программы Amber [19] и силового поля ff14SB [20] была промоделирована молекулярная динамика липоксигеназы LOX-15 в течение 10 нс с использованием стандартной модели металлсодержаще-

го сайта и модели КМ/ММ. Для оценки качества описания металлсодержащего сайта анализировали динамику расстояний от иона железа до координирующих его атомов азота гистидинов (рис. 5, табл. 1). Из таблицы видна тенденция к увеличению расстояния, а также к увеличению

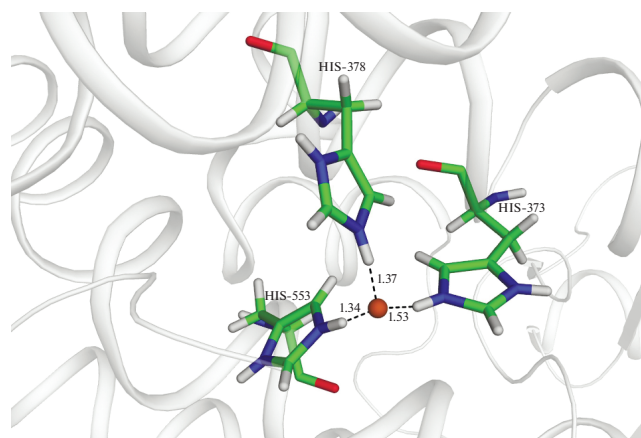
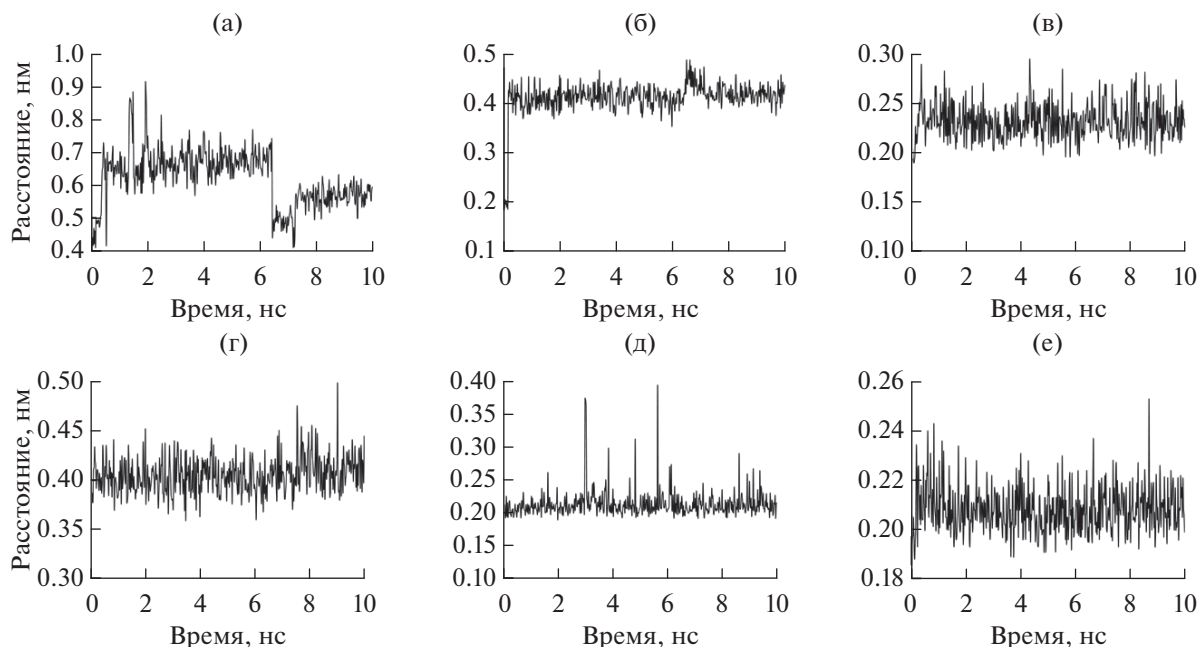


Рис. 4. Ион железа и координирующие его аминокислотные остатки в активном центре липоксигеназы LOX-15.



**Рис. 5.** Зависимость расстояния между атомом азота NE2 553-го (а, г), 373-го (б, д) и 378-го (в, е) гистидина и железом от времени в молекулярно-механической (а–в) и квантово-механической (г–е) моделях.

**Таблица 1.** Средние расстояния и стандартные отклонения расстояний между атомом азота NE2 553-го, 373-го и 378-го гистидина и ионом железа

№ аминокислотного остатка	Молекулярная механика		Квантовая механика	
	расстояние, нм	стандартное отклонение	расстояние, нм	стандартное отклонение
553	0.619	0.082	0.405	0.018
373	0.411	0.034	0.214	0.021
378	0.231	0.018	0.208	0.009

стандартного отклонения при использовании молекулярно-механической модели. Из этого следует, что координационная связь в случае стандартной молекулярно-механической модели присутствует не всегда, а также то, что металлсодержащий сайт относительно нестабилен. Рис. 5 подтверждает эти выводы. Например, видно, что для 553-го гистидина расстояние от координирующего атома азота до атома железа достигает в некоторых случаях 0.9 нм, что однозначно говорит о разрыве координационной связи. Для 373-го гистидина расстояние между ионом железа и координирующим атомом азота стабилизируется вблизи значения 0.411 нм со стандартным отклонением 0.034. Кроме того, из графиков можно видеть, что в случае применения молекулярно-механической модели наблюдается существенное отклонение расстояния между координирующими атомами азота и ионом железа в процессе моделирования от данных рентгеноструктурного анализа, что также говорит о том, что квантово-механическая модель более пригодна для исследования динамики LOX-15.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 19-14-00244) в части моделирования методами квантовой механики и молекулярной динамики и при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Государственного задания ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН в части анализа результатов молекулярного моделирования.

**Конфликт интересов:** авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Brash A.R.* // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 34. P. 23679. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.34.23679>
2. *Nelson M.J., Seitz S.P.* // Current Opinion Struct. Biol. 1994. V. 4. № 6. P. 878. [https://doi.org/10.1016/0959-440x\(94\)90270-4](https://doi.org/10.1016/0959-440x(94)90270-4)
3. *Куракин Г.Ф., Самоукина А.М., Потанова Н.А.* // Биохимия. 2020. Т. 85. № 9. С. 1256. <https://doi.org/10.31857/S0320972520090067>

4. Dixon S.J., Stockwell B.R. // *Nature Chem. Biol.* 2014. V. 10. № 1. P. 9.  
<https://doi.org/10.1038/nchembio.1416>
5. Stoyanovsky D.A., Tyurina Y.Y., Shrivastava I., Bahar I., Tyurin V.A., Protchenko O., Jadhav S., Bolevich S.B., Kozlov A.V., Vladimirov Y.A., Shvedova A.A., Philpott C.C., Bayir H., Kagan V.E. // *Free Radical Biol. Med.* 2019. V. 133. P. 153.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.008>
6. Weiland A., Wan, Y., Wu W., Lan X., Han X., Li Q., Wang J. // *Mol. Neurobiol.* 2019. V. 56. № 7. P. 4880.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-018-1403-3>
7. Mahoney-Sánchez L., Bouchaoui H., Ayton S., Devos D., Duce J.A., Devedjian J.C. // *Progress Neurobiol.* 2021. V. 196. P. 101890.  
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101890>
8. Zhang G., Zhang Y., Shen Y., Wang Y., Zhao M., Sun L. // *J. Alzheimer's Disease.* 2021. V. 80. № 3. P. 907.  
<https://doi.org/10.3233/JAD-201369>
9. Kobe M.J., Neau D.B., Mitchell C.E., Bartlett S.G., Newcomer M.E. // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. № 12. P. 8562.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.543777>
10. Senn H.M., Thiel W. // *Ang. Chem. Int. Ed.* 2009. V. 48. № 7. P. 1198.  
<https://doi.org/10.1002/anie.200802019>
11. Li P., Merz Jr K.M. // *Chem. Rev.* 2017. V. 117. № 3. P. 1564.  
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00440>
12. Li P., Merz Jr K.M. // *J. Chem. Inf. Modeling.* 2016. V. 56. № 4. P. 599.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00674>
13. Anandkrishnan R., Aguilar B., Onufriev A.V. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. № W1. P. W537.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gks375>
14. Salomon-Ferrer R., Case D.A., Walker R.C. // *WIRs: Comput. Mol. Sci.* 2013. V. 3. № 2. P. 198.  
<https://doi.org/10.1002/wcms.1121>
15. Barca G.M.J., Bertoni C., Carrington L. et al. // *J. Chem. Phys.* 2020. V. 152. № 15. P. 154102.  
<https://doi.org/10.1063/5.0005188>
16. Becke A.D. // *J. Chem. Phys.* 1993. V. 98. P. 5648.  
<https://doi.org/10.1063/1.464913>
17. Kohn W., Sham L.J. // *Phys. Rev. A.* 1965. V. 140. № 4. P. A1133.  
<https://doi.org/10.1103/PhysRev.140.A1133>
18. Hohenberg P., Kohn W. // *Phys. Rev. B.* 1964. V. 136. 3. P. B864.  
<https://doi.org/10.1103/PhysRev.136.B864>
19. Case D.A., Cheatham T.E. III, Darden T., Gohlke H., Luo R., Merz K.M. Jr, Onufriev A., Simmerling C., Wang B., Woods R.J. // *J. Comput. Chem.* 2005. V. 26. № 16. P. 1668.  
<https://doi.org/10.1002/jcc.20290>
20. Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K.E., Simmerling C. // *J. Chem. Theory Comput.* 2015. V. 11. № 8. P. 3696.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>
21. Berendsen H.J.C., Postma J.V., van Gunsteren W.F., Di-Nola A.R.H.J., Haak J.R. // *J. Chem. Phys.* 1984. V. 81. № 8. P. 3684.  
<https://doi.org/10.1063/1.448118>
22. Parrinello M., Rahman A. // *J. Chem. Phys.* 1982. V. 76. № 5. P. 2662.  
<https://doi.org/10.1063/1.443248>
23. Becke A.D. // *Phys. Rev. A.* 1988. V. 38. № 6. P. 3098.  
<https://doi.org/10.1103/PhysRevA.38.3098>
24. Ernzerhof M., Scuseria G.E. // *J. Chem. Phys.* 1999. V. 110. № 11. P. 5029.  
<https://doi.org/10.1063/1.478401>
25. Goerigk L., Hansen A., Bauer C., Ehrlich S., Najibi A., Grimme S. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2017. V. 19. № 48. P. 32184.  
<https://doi.org/10.1039/C7CP04913G>

## Study of Human Lipoxygenase by the Method of Molecular and Quantum Mechanics

A. A. Yurchenko<sup>1, \*</sup>, P. D. Korotkova<sup>2, \*\*</sup>, V. I. Timofeev<sup>3, 4</sup>, A. B. Shumm<sup>2, 5</sup>, Y. A. Vladimirov<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup>*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia*

<sup>2</sup>*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

<sup>3</sup>*Shubnikov Institute of Crystallography, FSRC "Crystallography and Photonics" RAS, Moscow, 119333 Russia*

<sup>4</sup>*National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia*

<sup>5</sup>*Lebedev Physical Institute RAS, Moscow, 119991 Russia*

\*e-mail: yurchekoanastasiaaa@yandex.ru

\*\*e-mail: korotkovapol@gmail.com

Lipoxygenases are a class of enzymes that catalyze the dioxygenation reaction of polyunsaturated fatty acids. By triggering lipid peroxidation, lipoxygenases can take part in the process of ferroptosis, which is associated with a number of pathological conditions, in particular, some diseases of the nervous system. Lipoxygenases are iron-containing proteins, in which the iron ion is located at the active site of the enzyme and is necessary for catalysis. Using a combined method of quantum and molecular mechanics, a model of the metal-containing site of LOX-15 lipoxygenase was obtained. Using the method of molecular dynamics and analysis of the coordination bonds of the iron ion of the active site of the enzyme, this model was shown to be more stable than the standard molecular mechanical model and more suitable for studying the mechanism of enzyme functioning.

**Keywords:** lipoxygenase, ferroptosis, molecular dynamics.