



УДК 577.112.013:577.322.7

ЛОКАЛЬНЫЕ ТЕМПЕРАТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОДВИЖНОСТИ В МОЛЕКУЛАХ ТИОРЕДОКСИНОВ ВЛИЯЮТ НА ИХ ТЕРМОСТАБИЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

© 2004 г. А. А. Полянский[#], Ю. А. Косинский, Р. Г. ЕфремовИнститут биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 25.08.2003 г. Принята к печати 15.11.2003 г.

Для определения подхода к разработке метода предсказания точечных мутаций, целенаправленно изменяющих термостабильность белковой молекулы, изучено влияние мутаций E85R и R82E на термостабильные свойства тиоредоксинов из *Escherichia coli* (Trx) и *Bacillus acidocaldarius* (BacTrx), соответственно. В качестве основного метода исследования использовали расчет молекулярной динамики с явно заданным растворителем при разных температурах (300 и 373 К). Анализ влияния повышения температуры на динамику белковой молекулы позволил выявить термолабильные области в Trx, BacTrx и их мутантах. Обнаружено влияние точечных мутаций на температурные изменения белковой подвижности в нескольких термолабильных участках. Полученные расчетные результаты согласуются с экспериментальными данными о том, что мутация E85R увеличивает термостабильность Trx, а мутация R82E уменьшает термостабильность BacTrx. Установлено, что ионные взаимодействия между обнаруженными участками важны для термостабильности данных белков. Точечные мутации изменяют параметры этих ионных взаимодействий, делая их более выгодными в мутанте E85R-Trx и менее выгодными – в мутанте R82E-BacTrx.

Ключевые слова: молекулярная динамика, подвижность белковых групп, термостабильность белка, точечные мутации, ионные взаимодействия.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы белкам из термофильных организмов уделяется пристальное внимание. Эти белки обладают уникальной устойчивостью к действию многих неблагоприятных факторов (повышенная температура, высокая ионная сила и пр.). Безусловно, определение механизмов термостабильности позволит сделать существенный шаг в понимании принципов стабилизации белковой молекулы, но при этом важен и практический результат. Современная биотехнологическая отрасль испытывает все большую потребность в новых стабильных ферментах, которые могли бы катализировать реакции при повышенной температуре, обеспечивая при этом высокий выход продукта и хорошую селективность. Поэтому часто возникает задача конструирования более термостабильного мутанта на основании уже изученного белка. Среди современных методов дизайна

термостабильных белков наибольшее распространение получили методы, основанные на случайном мутагенезе или сравнении рассматриваемого фермента с более термостабильным гомологом [1]. Эти методы имеют ряд ограничений: в первом случае – трудоемкость получения большого числа мутантов, во втором – необходимость знания аминокислотных последовательностей термофильных организмов. Перспективной альтернативой является предсказание точечных мутаций, увеличивающих термостабильность белка, на основании анализа его пространственной структуры [2–4].

В настоящее время получено большое число точечных мутантов различных белков как с увеличенной, так и с уменьшенной термостабильностью [3–9]. Часто влияние точечных мутаций на термостабильность связано с изменением характера ионных взаимодействий в мутанте по сравнению с белком дикого типа [4–8]. Например, за счет введения двойной мутации (E3R, E66L) в молекулу белка холодого шока Bs-CspV из мезофильного организма *Bacillus subtilis* удалось добиться увеличения температуры плавления (T_m) на 20.6°C и дополнительной стабилизации молекулы на 3.4 ккал/моль [6]. В результате замены двух экспонированных остатков глутаминовой

Сокращения: МД – молекулярная динамика; PCA – рентгеноструктурный анализ; PDB – Protein Data Bank – Брукхэйвенский банк данных белковых структур; RMSD – Root Mean Square Deviation – среднеквадратичные отклонения от начальной структуры; RMSF – Root Mean Square Fluctuation – среднеквадратичные отклонения от средней структуры.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 336-20-00; эл. почта: newant@nmr.ru).

кислоты было устранено невыгодное взаимодействие между близко расположенными остатками E3, E46 и E66. Кроме того, в мутантном белке E3R/E66L-Bs-CspB образовалась дополнительная ионная пара R3–E46.

Важность ионных взаимодействий для термостабильности отмечена во многих работах [10–15]. Кроме того, статистически выявлено, что белки из термофильных организмов демонстрируют повышенное содержание заряженных остатков по сравнению с мезофильными гомологами [15] и в большинстве случаев обладают меньшим “квазидипольным моментом” молекулы [16]. При этом роль ионных взаимодействий возрастает с повышением температуры за счет уменьшения диэлектрической проницаемости воды (если при 300 К константа диэлектрической проницаемости ϵ равна 80, при 373 К – 55) [10, 11]. Поэтому при проектировании новых точечных мутаций, увеличивающих термостабильность исследуемого белка, особое внимание следует уделять ионным взаимодействиям.

Проблему термостабильности белков из термофильных организмов часто связывают с особенностями их динамического поведения, причем существуют две противоположные точки зрения. Традиционно принято считать белки из термофилов более жесткими и компактными молекулами по сравнению с белками из мезофильных организмов. Однако в ряде работ показано, что, напротив, более термостабильные белки могут обладать большей подвижностью, чем их мезофильные гомологи (обычно эту подвижность связывают с низкоамплитудными движениями) [17–21]. Большое число *in vitro*- и *in silico*-экспериментов, говорящих в пользу как первой, так и второй концепции, позволяют предположить, что в природе существуют оба механизма приспособления белков к повышению температуры [22, 23]. Поэтому перед исследователем, проектирующим точечные мутации, которые призваны улучшить термостабильные свойства белка, возникает дилемма: ориентироваться ли на увеличение подвижности молекулы мутанта по сравнению с белком дикого типа или стараться получить более жесткую молекулу. При наличии сведений только о пространственной структуре исследуемого белка и в отсутствие каких-либо дополнительных данных задача становится крайне сложной. В этом случае, видимо, нужно несколько иное ее решение. В своей работе мы предлагаем новый подход, который позволяет определять *термолабильные* области белковой молекулы. В них при повышении температуры происходит наиболее существенное увеличение подвижности по сравнению с ее начальным уровнем. Так как обычно денатурация молекулы начинается в определенных точках [12, 24, 25], то обнаруженные термолабильные области могут быть потенци-

альными “проблемными” участками белковой молекулы, которые наиболее подвержены денатурации. В результате термостабильность молекулы будет зависеть от наличия подобных областей. В свою очередь, точечные мутации, направленные на увеличение термостабильности белка, следует проектировать с учетом их влияния на изменение подвижности при повышении температуры в подобных областях.

Среди современных методов компьютерного моделирования метод молекулярной динамики (МД) дает наиболее полную картину внутримолекулярных движений [26], а также активно используется в последнее время для исследования термостабильности [2–4, 13, 20, 21, 24, 25]. Кроме того, существуют некоторые примеры успешного использования МД для дизайна термостабильных белков [2–4]. Например, с помощью расчетов МД в молекуле галоалкандегалогеназы из *Xanthobacter autotrophicus* был обнаружен подвижный петлевой участок, который затем был закреплен за счет введения дополнительной дисульфидной связи [3]. Появление такой связи привело к увеличению значения T_m на 5°C.

Для определения термолабильных областей в белковой молекуле мы использовали расчеты МД белковой молекулы в явно заданном растворителе при нормальной и повышенной температуре (300 и 373 К соответственно). Это позволило определять подвижность участков полипептидной цепи при обеих температурах. Сопоставление полученных данных дает возможность выявить термолабильные области белка. В качестве модельной системы были выбраны два гомологичных тиоредоксина с известной пространственной структурой – из мезофильной бактерии *Escherichia coli* (Trx) [29, 31] и термофильной бактерии *Bacillus acidocaldarius* (VacTrx) [30]. Это небольшие белки, содержащие 108 (Trx) и 105 а.о. (VacTrx) (рис. 1). Степень идентичности их аминокислотных последовательностей – 50% (рис. 1d). VacTrx обладает большей термостабильностью, чем его мезофильный гомолог. Кроме того, известна мутация E85R, увеличивающая термостабильность Trx, и мутация R82E, уменьшающая термостабильность VacTrx [27, 28]. При этом экспериментально определенные значения T_m составляют 85, 90, 91 и 103°C для Trx, E85R-Trx, R82E-VacTrx, VacTrx соответственно [27, 28]. Мутанты E85R-Trx и R82E-VacTrx получены на основании сравнительного анализа аминокислотных последовательностей VacTrx и Trx. Для этой модельной системы нам удалось показать, что указанные мутации связаны с термолабильными областями в молекулах тиоредоксинов, и их влияние на термостабильность основано на изменении внутримолекулярных ионных взаимодействий.

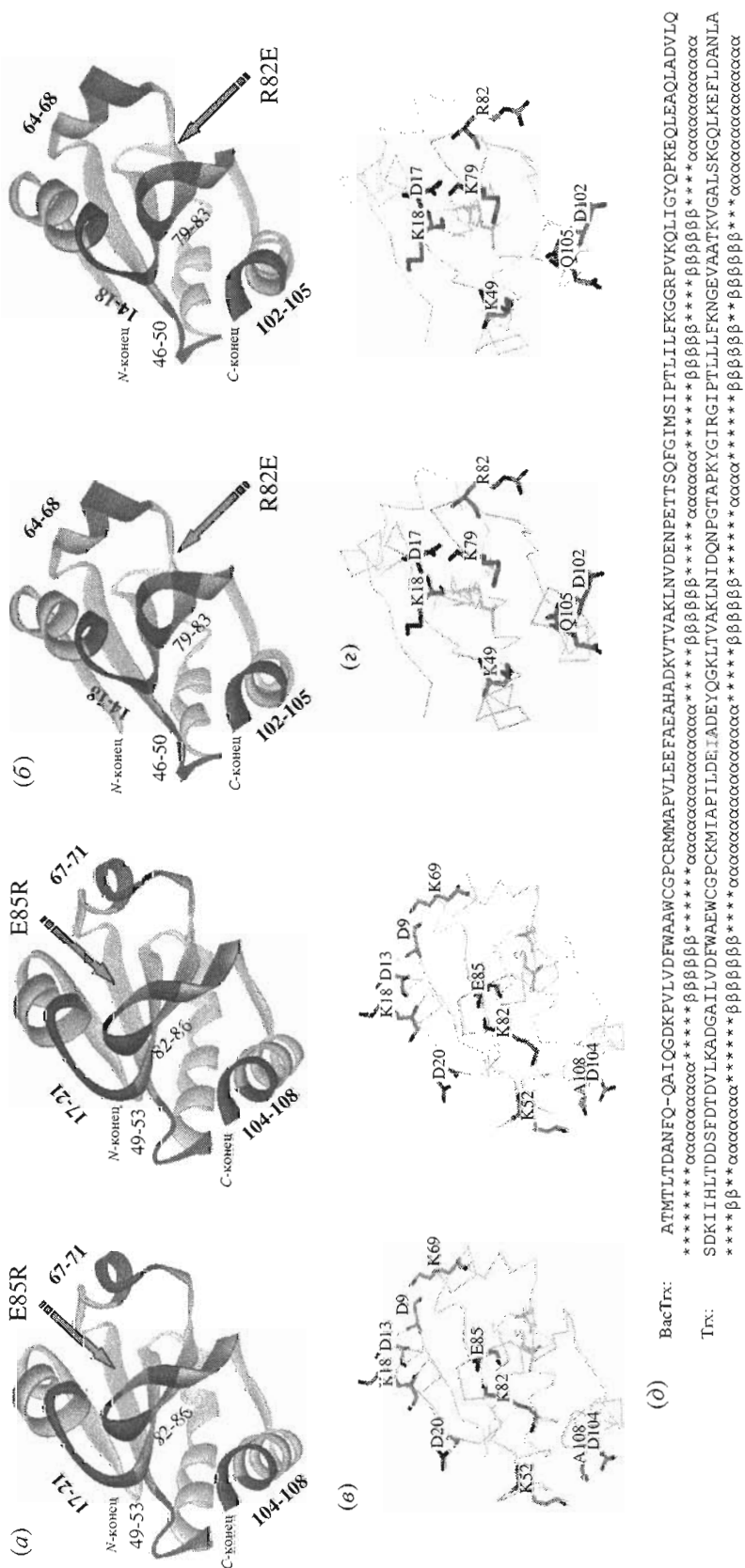


Рис. 1. Пространственная структура молекул Ttx (a) и VasTtx (б). Полипептидные цепи молекул изображены в виде ленточных диаграмм. Темно-серым цветом и цифрами отмечены термолabileльные области. Области мутации показаны стрелками. На рис. в и г показаны заряженные аминокислотные остатки из термолabileльных областей соответствующих белков. На рис. д представлены выравненные аминокислотные последовательности для Ttx и VasTtx: α – α-спиральные участки вторичной структуры белка, β – β-слои, – петлевые участки.

Таблица 1. Траектории МД

Параметры*	Тгх	Е85R-Тгх	ВасТгх	Р82Е-ВасТгх
Число траекторий	2; 3	3; 3	3; 2	2; 2
Среднее значение $RMSD$, Å	2.0; 2.5	2.2; 2.1	2.2; 2.1	2.4; 2.7
Коэффиц. коррел. значений $RMSF$	0.90; 0.93	0.92; 0.85	0.87; 0.84	0.88; 0.84

* Через точку с запятой приведены параметры, соответствующие 300 и 373 К.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате расчетов МД было получено 20 траекторий длиной 2.5 нс каждая (табл. 1). Во всех вычислительных экспериментах белки проявляли относительную стабильность. Значения среднеквадратичных отклонений ($RMSD$) координат атомов белка от их величины в начальной структуре варьировали в пределах 2.0–2.4 Å для расчетов МД при 300 и 2.1–2.7 Å – при 373 К (табл. 1). Период уравнивания для всех траекторий в среднем составлял 300–400 пс. При повышенной температуре белки не денатурировали, наблюдались лишь некоторые флуктуации вторичной структуры. Для однотипных траекторий, полученных в одинаковых условиях для каждого белка, наблюдается хорошая воспроизводимость результатов. Вследствие этого средние величины коэффициента парной корреляции значений среднеквадратичных отклонений от средней равновесной МД-структуры для атомов основной цепи каждого аминокислотного остатка ($RMSF$), полученных в результате обработки аналогичных траекторий МД, лежат в пределах 0.84–0.93 (табл. 1).

Подвижность белков при 300 и 373 К

Для оценки подвижности белка при нормальной и повышенной температуре использовали величину $\langle RMSF \rangle$ (см. “Эксперимент. часть”). Для Тгх, Е85R-Тгх, ВасТгх, Р82Е-ВасТгх при 300 и 373 К наблюдается несколько пиков значений $\langle RMSF \rangle$, соответствующих наиболее подвижным участкам молекулы (рис. 2). К этим подвижным участкам относятся, прежде всего, области мутаций 82–86 в Тгх/Е85R-Тгх и 79–83 в ВасТгх/Р82Е-ВасТгх, а также некоторые другие области: 17–21, 49–53, 67–71, 104–108 для Тгх/Е85R-Тгх и 14–18, 46–50, 64–68, 101–105 для ВасТгх/Р82Е-ВасТгх. Эти области при 300 К одинаково выражены во всех четырех белках и, в основном, соответствуют неструктурированным участкам тиоредоксина. Для Тгх/Е85R-Тгх – это петли между $\alpha 1$ и $\beta 2$ (17–21), $\alpha 2$ и $\beta 3$ (49–53), $\beta 4$ и $\beta 5$ (82–86), С-конец (104–108). Для ВасТгх/Р82Е-ВасТгх – это пегли между $\alpha 1$ и $\beta 1$ (14–18), $\alpha 2$ и $\beta 2$ (46–50), $\beta 3$ и $\beta 4$ (79–83), С-конец (102–105). Повышение температуры приводит к тому, что подвижность в указанных областях возрастает (сравни рис. 2а и рис. 2б), величина изме-

нения $\langle RMSF \rangle$ различна для всех четырех белков. Наиболее чувствительным к повышению температуры является Тгх, наименее чувствительным – ВасТгх. При этом особо выделяются области мутаций и участок 49–53 для Тгх и Е85R-Тгх, а также фрагмент 46–50 для ВасТгх и Р82Е-ВасТгх (рис. 2б). По величине $\langle RMSF \rangle$ для этих областей белки располагаются в обратном порядке по сравнению с порядком по значениям T_m . Так, наиболее термостабильный белок ВасТгх имеет самые низкие значения $\langle RMSF \rangle$, и наоборот, наибольшие значения $\langle RMSF \rangle$ характерны для наименее стабильного белка Тгх.

Влияние мутаций на изменение подвижности, связанное с повышением температуры

Для каждой из перечисленных выше областей определяли величину $\langle \Delta RMSF^{int} \rangle$, которая позволяет оценить влияние повышения температуры на изменение подвижности соответствующего участка (см. “Эксперимент. часть”). Кроме того, значения $\langle \Delta RMSF^{int} \rangle$ для белков дикого типа и их мутантов позволяют оценить влияние мутаций на термостабильность соответствующих областей (рис. 3). Мутации в обоих случаях противоположным образом влияли на величину $\langle \Delta RMSF^{int} \rangle$ на участках 17–21, 49–53, 104–108 для Тгх и Е85R-Тгх и аналогичных участках для ВасТгх и Р82Е-ВасТгх. При этом в случае мутации Е85R, увеличивающей термостабильность Тгх, происходило уменьшение $\langle \Delta RMSF^{int} \rangle$ на участках 17–21, 49–53 и увеличение – на участке 104–108 (рис. 3а). Например, $\langle \Delta RMSF^{int} \rangle$ для Тгх на участке 49–53 составляет 0.36 Å, для Е85R-Тгх – 0.17 Å. Обратная картина наблюдалась в случае мутации Р82Е, уменьшающей термостабильность ВасТгх (рис. 3б). Чтобы выяснить, являются ли указанные различия статистически значимыми, осуществляли проверку статистических гипотез об отличии соответствующих наборов $\Delta RMSF^{int}$. Было установлено, что для пары Тгх/Е85R-Тгх наиболее значимым является отличие $\langle \Delta RMSF^{int} \rangle$ на участках 49–53, 104–108 (доверительные вероятности составляют 0.99 и 0.96 соответственно), для пары ВасТгх/Р82Е-ВасТгх – отличие $\langle \Delta RMSF^{int} \rangle$ на участке 14–18 (доверительная вероятность составляет 0.90).

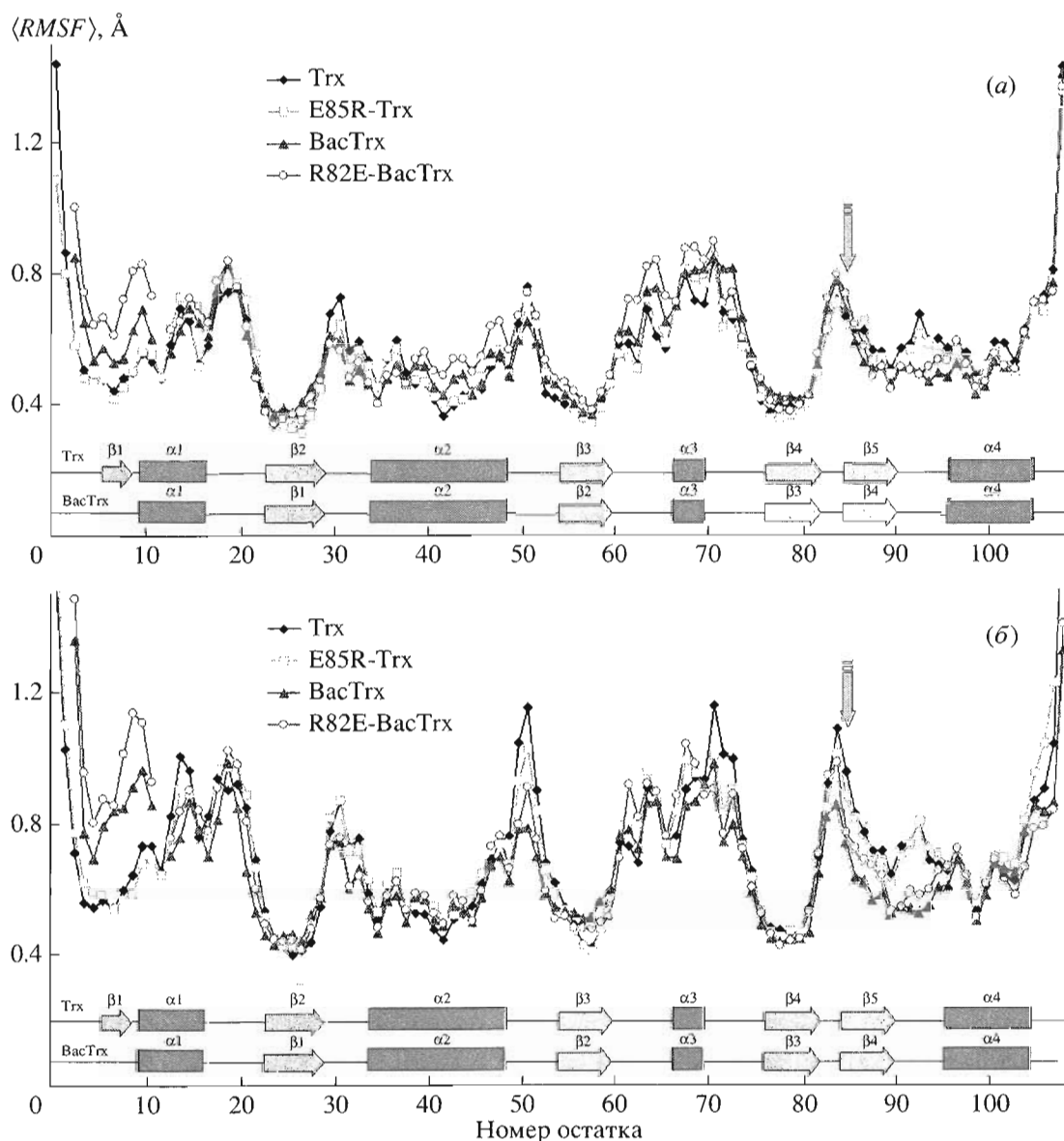


Рис. 2. Подвижность белков при температурах 300 (а) и 373К (б). Показаны значения $\langle RMSF \rangle$. Области мутации отмечены вертикальными стрелками. Элементы вторичной структуры обозначены: \Rightarrow – β -слои, \blacksquare – α -спирали.

Влияние мутаций на ионные взаимодействия между термолabileльными областями соответствующих молекул

Ионные взаимодействия и их изменения в результате точечных мутаций существенно влияют на термостабильность белковой молекулы (см. выше). Нами были изучены ионные взаимодействия между обнаруженными термолabileльными участками в Trx, BacTrx и их мутантах. Общий характер влияния мутаций на ионные взаимодействия внутри рассматриваемых молекул был оценен с помощью величины “квазидипольного момента” D (см. “Эксперимент. часть”), значения модуля которого представлены в табл. 2. Видно, что мутация E85R уменьшает среднее значение D

для молекулы Trx при обеих температурах, тогда как мутация R82E в BacTrx – вызывает противоположный эффект. При этом повышение температуры приводит к незначительному уменьшению величины D в E85R-Trx и BacTrx и увеличению этой же величины в Trx и R82E-BacTrx. Величина D позволяет судить о характере ионных взаимодействий внутри белка и их эффективности. Показано, что для более термостабильных белков значения D меньше, чем для их менее термостабильных гомологов [16]. Сходная картина наблюдается и для рассматриваемых пар белков. Стоит отметить, что значение D тем меньше, чем более сбалансированными являются ионные взаимодействия в белке.

Влияние температуры и мутаций на ионные взаимодействия между термолabileльными участками рассматриваемых белков отражено на рис. 4. Мутация E85R в T_{rx} приводит к увеличению эффективности ионных взаимодействий между областями 49–53, 82–86 и C-концевой областью (104–108), а также N-концевого участка и областью 67–71 (рис. 4а, б). Это обусловлено возникновением дополнительных ионных пар между термолabileльными участками в E85R-T_{rx} по сравнению с T_{rx}: K52-D104, K82-D104 и др. (табл. 3). Кроме того, для некоторых ионных пар наблюдается уменьшение среднего расстояния $\langle R \rangle$ (см. “Эксперимент. часть”) между заряженными атомами: в случае K52-A108 величина $\langle R \rangle$ уменьшилась с 7.14 до 6.87 Å, в случае K69-D9 – с 7.81 до 4.99 Å и др. Напротив, мутация R82E в VacT_{rx} приводит к уменьшению эффективности ионных взаимодействий между областями 46–50, 79–83 и C-концевой областью (102–105), а также между 14–18 и 79–83 (рис. 4в, г). При этом часть ионных пар утрачивается: K49-D102, R82-D17 (табл. 3). Для других же ионных пар наблюдается увеличение значений $\langle R \rangle$: в случае K79-D17 – с 5.24 до 7.96 Å, в случае K79-Q105 – с 5.81 до 7.52 Å.

Рассматриваемые мутации влияют на чувствительность некоторых ионных пар к повышению температуры. Это проявляется в изменении функции плотности вероятности ($F_{N_1-N_2}^R$) для соответствующих расстояний при повышении температуры. На рис. 5 приведены наиболее яркие примеры. Так, для пары K52-A108 в T_{rx} при 373 К наблюдается значительное уширение кривой F_{52-108}^R , тогда как этот эффект менее заметен в E85R-T_{rx}. Для пары K79-Q105 в VacT_{rx} повышение температуры приводит к смещению максимума функции F_{79-105}^R в область меньших расстояний, при этом в R82E-VacT_{rx} наблюдается обратный эффект.

Результаты, полученные с использованием метода МД, позволяют детально анализировать влияние температуры на динамику белковой молекулы. В настоящей работе были определены участки бел-

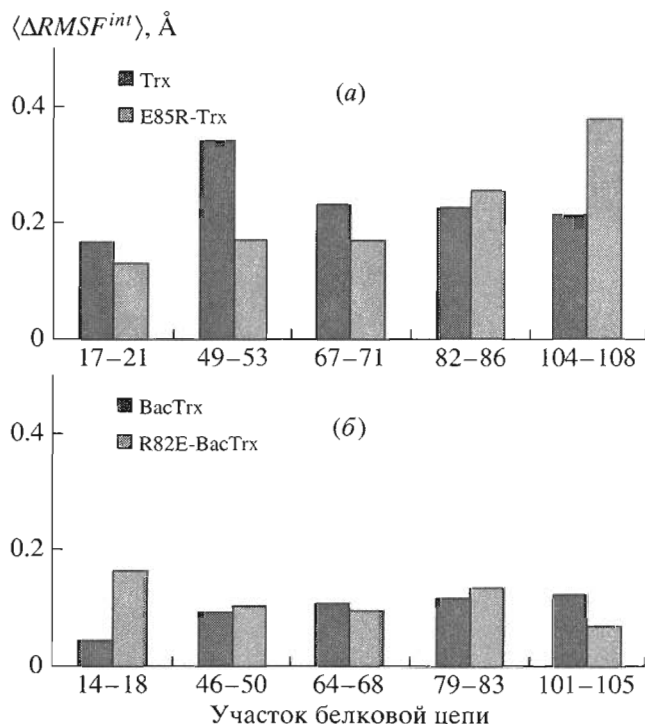


Рис. 3. Влияние мутаций E85R (а) и R82E (б) на изменения подвижности (значения $\langle \Delta RMSF^{int} \rangle$), зависящие от температуры, для некоторых термолabileльных областей рассматриваемых белков.

ковой глобулы, наиболее чувствительные к повышению температуры. Такие участки могут быть потенциальными мишенями для целенаправленного введения точечных мутаций, изменяющих термостабильные свойства белка. При этом подвижные области в белках, выявленные с помощью МД-расчетов (рис. 2), хорошо согласуются с результатами, полученными при анализе имеющихся для T_{rx} и VacT_{rx} наборов ЯМР-структур (рис. 6). Коэффициенты парной корреляции между кривыми $RMSF$, полученными на основании расчетов МД и анализа ЯМР-структур, составляют 0.66 и 0.67 для T_{rx} и VacT_{rx} соответственно. Из данных PCA для T_{rx} доступны значения температурного B-фак-

Таблица 2. Величины модулей “квазидипольных моментов” (D, Дб) молекул тиоредоксинов, рассчитанных на основании данных МД-расчетов для 300 (А) и 373 К(Б)

Белок	D1*		D2		D3		$\langle D4 \rangle^{**}$	
	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
T _{rx}	2.71	3.15	2.85	3.00	–	2.85	2.87	3.00
E85R-T _{rx}	1.82	1.60	1.73	1.75	1.83	1.87	1.79	1.74
VacT _{rx}	1.74	1.37	1.65	1.47	1.21	–	1.53	1.42
R82E-VacT _{rx}	1.38	2.14	1.89	1.92	–	–	1.64	2.03

* Значения D1-D3 определены путем обработки соответствующих однотипных траекторий.

** Среднее значение.

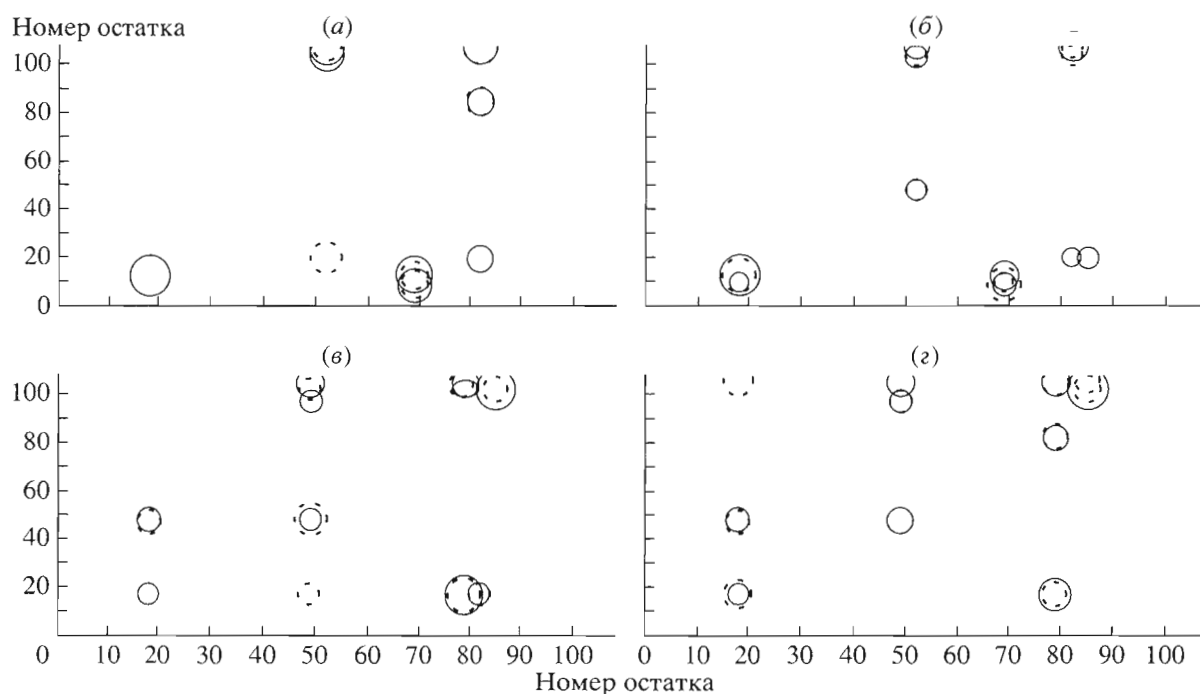


Рис. 4. Ионные взаимодействия (сплошные кружки – при 300 К, пунктирные – при 373 К) между термолабильными областями в Trx (а), E85R-Trx (б), VasTrx (в), R82E-VasTrx (г). Диаметры кружков обратно пропорциональны значениям соответствующих расстояний.

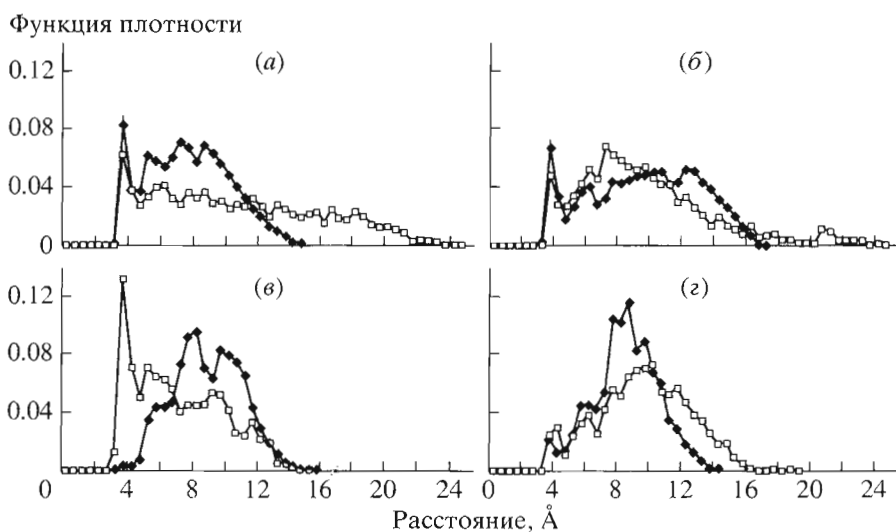


Рис. 5. Температурные изменения функций плотности вероятностей ($F_{N_1-N_2}^R$) для пар: K52-A108 в Trx (а), K52-A108 в E85R-Trx (б), K79-Q105 в VasTrx (в), K79-Q105 в R82E-VasTrx (г). Темные точки – 300 К, светлые – 373 К.

тора (рис. 6а). Несмотря на количественное отличие значений $RMSF$, полученных из МД-траекторий и $RMSF$, а также величин B -фактора, полученных на основании экспериментальных данных, качественная картина сохраняется. Это позволяет считать результаты МД достоверно отражающими картину внутримолекулярных движений в исследуемых белках.

Обнаруженные термолабильные области близко расположены друг к другу (рис. 1) и обладают интересной особенностью – в каждой имеется один или несколько экспонированных заряженных аминокислотных остатков. Поэтому можно предположить наличие ионных взаимодействий между этими заряженными остатками (рис. 1в,г). При этом мутации E85R для Trx и R82E для Vas-

Тгх меняют знак заряда ионогенных групп в точке мутации на противоположный. Это реорганизует сеть ионных взаимодействий и влияет на термостабильность мутируемой молекулы. Изменение в характере ионных взаимодействий отражается на динамических свойствах выявленных нами термолабильных областей для всех четырех белков. Установлено, что ионные взаимодействия и наличие их разветвленной сети влияют на термостабильность белковой молекулы [4–8, 10–15]. Ранее механизм действия мутаций видели в образовании дополнительных водородных связей для Тгх (R85 – С-конец) в случае мутации E85R, и, наоборот, утрате таковых для ВаcТгх (R82-G16, R82-D17) – в случае мутации R82E [27, 28]. Эти заключения основаны на анализе МД-траекторий, рассчитанных в вакууме при 500 К в течение ~100 пс. Полученные в настоящей работе результаты показали, что подобные водородные связи не наблюдаются в процессе МД при 300 К. При 373 К вероятность образования в E85R-Тгх водородной связи R85–С-конец (A108) крайне низкая ($P_{85-108} \approx 0.01$), и вряд ли это может влиять на термостабильность (см. “Эксперимент. часть”). Та же картина наблюдается и для R82 в ВаcТгх. При 373 К образование подобных водородных связей с участием R82 маловероятно ($P_{82-16} \approx 0.03$, $P_{82-17} \approx 0.04$). Поэтому ключевую роль мы отводим ионным взаимодействиям K52–С-конец–K82, K69–N-конец, K82–петля $\alpha 1$ - $\beta 2$ (17–21) в Тгх/E85R-Тгх и K49–С-конец–K79, K82–петля $\alpha 1$ - $\beta 1$ (14–18) в ВаcТгх/R82E-ВаcТгх. Ионные взаимодействия определяли для всех противоположно заряженных атомов, расположенных на расстоянии менее 9 Å. Это позволило учитывать дальние взаимодействия, электростатическая энергия которых при 300 К сравнима с энергией тепловых флуктуаций, однако при повышении температуры до 373 К эта энергия возрастает за счет уменьшения диэлектрической проницаемости растворителя.

В результате мутации E85R в Тгх ионные взаимодействия между термолабильными областями становятся более выгодными за счет изменения взаимной ориентации остатков K52, K82, K69, R85 и соответствующих отрицательно заряженных аминокислот. Причина таких изменений кроется во влиянии R85 на расположенные рядом остатки K52, K82, K69. К примеру, если в Тгх K82 может взаимодействовать с E85, то в E85R-Тгх такое взаимодействие невозможно, и K82 начинает дополнительно взаимодействовать с D104 (табл. 3). В мутанте K69 оказывается расположен существенно ближе к N-концевой области. В свою очередь, мутация R82E делает ионные взаимодействия в ВаcТгх между термолабильными областями менее выгодными. E82 по-новому ориентирует расположенные рядом с ним остатки K49, K79, K18. Так, если K79 в ВаcТгх одинаково сильно взаимодействует и с С-концом (Q105) и с петлей

Таблица 3. Влияние мутаций на изменение значений среднего расстояния ($\langle R \rangle$) между атомами кислорода и азота заряженных аминокислотных остатков из разных термолабильных областей рассматриваемых молекул. (На основании расчетов МД при 373 К)

Ионные пары		$\langle R \rangle$, Å	
Остаток 1 (атом)	Остаток 2 (атом)	Дикий тип	Мутант
ВаcТгх, R82E-ВаcТгх			
K18	D17 (O $\delta 2$)	>9	6.72
K18	Q105 (O 2)	>9	6.65
K49	D17 (O $\delta 2$)	8.79	>9
K49	D48 (O $\delta 2$)	5.88	7.37
K49	D102 (O $\delta 2$)	8.34	>9
K79	D17 (O $\delta 2$)	5.24	7.96
K79	Q105 (O 1)	5.81	7.52
K79	E82 (O $^{\epsilon 1}$)	–	7.36
R82	D17 (O $\delta 2$)	7.75	–
K85	Q105 (O 2)	>9	8.97
Тгх, E85R-Тгх			
K18	D13 (O $\delta 1$)	>9	4.98
K52	D20 (O $\delta 2$)	7.30	>9
K52	E48 (O $^{\epsilon 1}$)	>9	8.35
K52	D104 (O $\delta 1$)	>9	8.23
K52	A108 (O 1)	7.14	6.87
K69	D9 (O $\delta 2$)	7.81	4.99
K69	D10 (O $\delta 2$)	>9	8.12
K69	D13 (O $\delta 2$)	8.63	6.16
K82	D20 (O $\delta 2$)	8.60	8.81
K82	E85 (O $^{\epsilon 1}$)	7.86	–
K82	D104 (O $\delta 2$)	>9	7.64
K82	A108 (O 2)	6.40	7.83

* Атом N $^{\zeta}$ для остатков лизина (K) и N $^{\eta 1}$ для остатка аргинин-82.

$\alpha 1$ - $\beta 1$ (D17), то в R82E-ВаcТгх он начинает взаимодействовать с E82 и при этом отдаляется от своих первоначальных партнеров (табл. 3).

Описанные изменения в характере ионных взаимодействий в результате мутаций влияют на динамические свойства соответствующих областей и их чувствительность к повышению температуры и, как следствие, – на термостабильность белков в целом. Поэтому, если возникает задача поиска точечных мутаций, влияющих на термостабильность белковой молекулы, то, как показывают результаты нашей работы, следует ориентироваться не на общее увеличение или уменьшение белковой подвижности, а на изменение чувствительности отдельных участков белковой

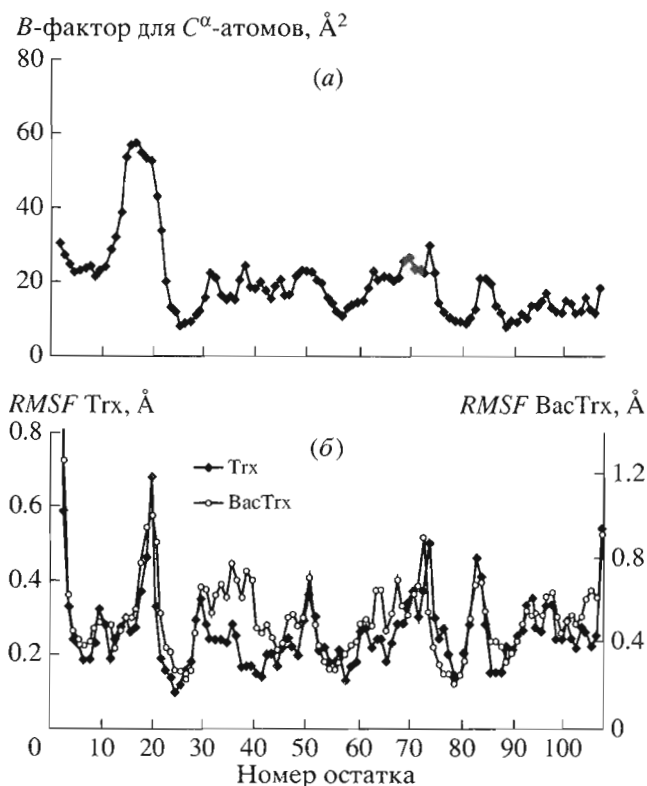


Рис. 6. Подвижность Trx и VacTrx, определенная на основании данных PCA [29] и данных ЯМР [30, 31]. (а) – значения температурного *B*-фактора для Trx, (б) – значения *RMSF*, определенные для наборов ЯМР-структур Trx и VacTrx.

молекулы к повышению температуры. Разработанный метод определения термоллабильных областей белка является первым шагом в предсказании необходимых мутаций.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследуемые объекты

Для исследований были взяты два набора ЯМР-структур для Trx (1XOB) и VacTrx (1QUW) из Банка данных белковых структур (PDB). Точечные мутанты E85R-Trx и R82E-VacTrx получены на основании имеющихся структур для Trx и VacTrx в программе Swiss-PdbViewer [39].

Расчеты молекулярной динамики

При температурах 300 и 373 К для всех четырех молекул (Trx, E85R-Trx, VacTrx, R82E-VacTrx) было получено по несколько траекторий МД длительностью 2.5 нс. Расчеты МД проводили на компьютерах Athlon XP с помощью программных пакетов GROMACS 3.0.2 и GROMACS 3.1.1 [32]. В обоих случаях использовали тяжело-атомное силовое поле с полярными протонами Gromos 96 [33] и термостат Берендсена. Расчеты выполняли

с периодическими граничными условиями в ансамбле NVT. В качестве растворителя использовали SPC-модель воды, которая позволяет проводить расчеты при температурах ~373 К без существенных изменений в структуре растворителя [34]. До вычисления МД с помощью указанных программных пакетов проводили поэтапную минимизацию энергии системы методом наискорейшего спуска: с фиксированием всей белковой молекулы (300 шагов), с фиксированием атомов основной цепи белка (300 шагов), без фиксирования основных групп (300 шагов). Затем производили линейный нагрев системы до необходимой температуры (1000 шагов для 300 К и 2000 шагов – для 373 К). Стабильность структуры в процессе расчета МД оценивали величиной *RMSD*:

$$RMSD_j = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\mathbf{r}_{ij} - \mathbf{r}_j)^2}, \quad (1)$$

где \mathbf{r}_{ij} – радиус-вектор атома j в i -момент времени, \mathbf{r}_j – радиус-вектор атома j в начальной структуре.

Обработка результатов МД-расчетов

Оценка подвижности. В качестве меры подвижности белковых групп использовали величину *RMSF* [20, 21, 35, 36]. Значение *RMSF* вычисляли по формуле:

$$RMSF_j = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\mathbf{r}_{ij} - \langle \mathbf{r}_j \rangle)^2}, \quad (2)$$

где \mathbf{r}_{ij} – радиус-вектор атома j в i -момент времени, $\langle \mathbf{r}_j \rangle$ – радиус-вектор атома j в средней структуре. Рассчитанные траектории МД разбивали на 9–10 участков, длина которых составляла в среднем по 220 пс. Значение *RMSF* для аминокислотных остатков на полученных участках траектории определяли в программе MolMol [37] согласно (2). Таким образом, в результате анализа каждой траектории получали 9–10 наборов значений *RMSF*. При этом для каждого типа траекторий производили усреднение всех имеющихся значений *RMSF* и получали соответствующие наборы $\langle RMSF \rangle$. Для оценки подвижности отдельного участка N_1 – N_2 белковой цепи использовали значения $RMSF^{int}$, которые определяли по формуле:

$$RMSF^{int} = \frac{1}{N_2 - N_1} \sum_{i=N_1}^{N_2} RMSF_i, \quad (3)$$

где N_2 , N_1 – номера аминокислотных остатков, $RMSF_i$ – значение *RMSF* для i -го остатка. Изменение подвижности на участке белковой цепи в результате повышения температуры характеризовали величиной $\Delta RMSF^{int}$, которую определяли по формуле:

$$\Delta RMSF^{int} = RMSF_{373\text{ K}}^{int} - RMSF_{300\text{ K}}^{int}, \quad (4)$$

где $RMSF_{373\text{ K}}^{int}$, $RMSF_{300\text{ K}}^{int}$ – значения $RMSF^{int}$ для участка, рассчитанные на основании траекторий МД при 300 и 373 К соответственно. Для оценки значимости наблюдаемых отличий в динамическом поведении разных белков на выделенных участках при повышении температуры осуществляли проверку статистических гипотез об отличии соответствующих наборов значений $\Delta RMSF^{int}$ по t -критерию и использовали t -распределение с 37 степенями свободы. При этом были рассчитаны соответствующие доверительные вероятности и усредненные значения $\langle \Delta RMSF^{int} \rangle$.

Анализ вторичной структуры и водородных связей. Вторичную структуру белков определяли с помощью программ DSSP [38] и do_dssp из пакета GROMACS. Водородные связи между белковыми группами определяли в программе MolMol. При этом вводили следующие ограничения на водородную связь: расстояние между донором (D) и акцептором (A) водородной связи – менее 2.4 Å, угол между связями D–H и H::A – более 145°. Среднее число водородных связей, образуемых между остатком k и остатком l на протяжении всех траекторий МД, оценивали по формуле:

$$P_{k-l} = \frac{1}{N_{PDB}} \sum_{i=1}^{N_{PDB}} Hb_i^{k-l}, \quad (5)$$

где N_{PDB} – число анализируемых структур в выборке, полученной из траекторий МД, Hb_i^{k-l} – число водородных связей между остатками k и l в i -й структуре. Величина P_{k-l} отражает вероятность образования водородной связи данного типа.

Анализ ионных взаимодействий. Анализ эффективности ионных взаимодействий и влияния на них мутаций осуществляли несколькими способами. В качестве меры общей эффективности ионных взаимодействий использовали так называемый “квазидипольный момент” молекулы [16], который определяли согласно формуле:

$$D = Q_{tot} \left(\frac{\sum \mathbf{r}_i \cdot q_i^+}{p} - \frac{\sum \mathbf{r}_i \cdot q_i^-}{n} \right), \quad (6)$$

$$p = \sum_i q_i^+, \quad n = \sum_i q_i^-,$$

где Q_{tot} – суммарный заряд белковой молекулы, \mathbf{r}_i – радиус-вектор атома i , q_i^+ , q_i^- – парциальные заряды i -го атома. В отличие от дипольного момента, D не зависит от выбора системы координат и в случае $Q_{tot} \neq 0$. Для каждой молекулы определяли среднюю величину D при температурах 300 и 373 К на основании данных расчета соответствующих тра-

екторий МД. Были составлены карты ионных взаимодействий для Trx, E85R-Trx, VacTrx, R82E-VacTrx. Считали, что противоположно заряженные аминокислоты (R, K/E, D, C-конец) образуют ионную пару, если расстояние r_i между соответствующими атомами азота и кислорода меньше 9 Å. Для каждой ионной пары значения расстояния усредняли по траектории МД, в результате чего были получены соответствующие значения $\langle R \rangle$. При этом картирование осуществляли с интервалом ≈ 120 пс, что позволяло для одной траектории получать 18–20 значений r_i . Для некоторых r_i с помощью утилиты g_dist из пакета GROMACS значения определяли на протяжении всей траектории МД с интервалом 4 пс, что позволило построить соответствующие функции распределения и плотности вероятности (F_{N1-N2}^R). Значения функции плотности вероятности для выбранного расстояния определяли по формуле:

$$F_{N1-N2}^R(x) = \frac{Q_{r_i \leq x + \Delta x} - Q_{r_i \leq x}}{Q_{r_i < R_{cutoff}}}, \quad (7)$$

где $N1$, $N2$ – номера аминокислотных остатков, участвующих в образовании ионной пары, $Q_{r_i < R_{cutoff}}$ – общее количество структур, в которых значение r_i для рассматриваемых аминокислотных остатков меньше радиуса отсечки, $Q_{r_i \leq x} - Q_{r_i \leq x + \Delta x}$ – количество структур, в которых значение r_i удовлетворяет заданным условиям.

Все вычисления, для которых не указаны ссылки на соответствующие программы, были проведены с помощью оригинальных утилит, разработанных нами на языке MS Visual Basic.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lehmann M., Wyss M. // Curr. Opin. Biotech. 2001. V. 12. P. 371–375.
2. Li B., Alonso D.O.V., Dagget V. // Structure. 2002. V. 10. P. 989–998.
3. Pikkemaat M.G., Linssen A.B.M., Berendsen H.J.C., Janssen D.B. // Protein Eng. 2002. V. 15. P. 185–192.
4. Liu H.L., Wang W.C. // Protein Eng. 2003. V. 16. P. 19–25.
5. Merz A., Knochel T., Jansonius J.N., Kirschner K. // J. Mol. Biol. 1999. V. 288. P. 753–763.
6. Perl D., Mueller U., Heinemann U., Schmid F. X. // Nat. Struct. Biol. 2000. V. 7. P. 380–383.
7. Vetrani C., Maeder D.L., Tolliday N., Yip K.S.-P., Stillman T.J., Britton K.L., Rice D.W., Klump H.H., Robb F.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 12300–12305.
8. Bogin O., Levin I., Hachaman Y., Tel-Or S., Peretz M., Frolow F., Burstein Y. // Protein Sci. 2002. V. 11. P. 2561–2574.
9. Christodoulou E., Rypniewski W.R., Vorgias C.R. // Extremophiles. 2003. V. 7. P. 111–122.

10. Kumar S., Nussinov R. // *Cell Mol. Life Sci.* 2001. V. 58. P. 1216–1233.
11. Sanchez-Ruiz J.M., Makhatadze G.I. // *Trends Biochem. Sci.* 2001. V. 19. P. 132–135.
12. Jaenicke R. // *Biochem. (Moscow)*. 1998. V. 63. P. 312–321.
13. de Bakker P. I., Hundnberer P. H., McCammon J.A. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 285. P. 1811–1830.
14. Cavagnero S., Debe D.A., Zhou Z.H., Adams M.W., Chan S.I. // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 3369–3376.
15. Vielle C., Zeikus G.J. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001. V. 65. P. 1–43.
16. Mozo-Villarias A., Cedano J., Querol E. // *Protein Eng.* 2003. V. 16. P. 279–286.
17. Tehei M., Maderh D., Pfister C., Zaccai G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 14356–14361.
18. Shuler B., Kremer W., Kalbitzer H.R., Jaenicke R. // *Biochemistry*. 2002. V. 41. P. 11670–11680.
19. Hernandez G., Jenney F.E., Jr., Adams M.W.W., LeMaster D.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 3166–3170.
20. Grottesi A., Ceruso M.A., Colosimo A., Di Nola A. // *Proteins*. 2002. V. 46. P. 287–294.
21. Wintrode P. L., Zhang D., Vaidehi N., Arnold F.H., Goddard III W.A. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 327. P. 745–757.
22. Kinjo A. R., Nishikawa K. // *Eur. Biophys. J.* 2001. V. 30. P. 378–384.
23. Jaenicke R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 2962–2964.
24. Sham Y.Y., Ma B., Tsai C.-J., Nussinov R. // *Proteins*. 2002. V. 46. P. 308–320.
25. Lazaridis T., Lee I., Karplus M. // *Protein Sci.* 1997. V. 6. P. 2589–2605.
26. Karplus M., McCammon J.A. // *Nat. Struct. Biol.* 2002. V. 9. P. 646–652.
27. Pedone E., Saviano M., Rossi M., Bartolucci S. // *Protein Eng.* 2001. V. 14. P. 255–260.
28. Pedone E., Cannio R., Saviano M., Rossi M., Bartolucci S. // *Biochem. J.* 1999. V. 339. P. 309–317.
29. Katti S.K., LeMaster D.M., Eklund H. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 212. P. 167–184.
30. Nicastro G., de Chiara C., Pedone E., Rossi M., Bartolucci S. // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. P. 403–413.
31. Jeng M.F., Campbell A.P., Begley T., Holmgren A., Case D.A., Wright P.E., Dyson H.J. // *Structure*. 1994. V. 2. P. 853–868.
32. Lindahl E., Hess B., van der Spoel D. // *J. Mol. Mod.* 2001. V. 7. P. 306–317.
33. Walser R.P.S., Huninberg P. H., Tironi I.G., Mark A.E., Billeter S.R., Fennen J., Torda A.E., Huber T., Kruger P., van Gunsteren W.F. // *J. Phys. Chem.* 1999. V. 103. P. 3596–3607.
34. Walser R., Mark A.E., van Gunsteren W.F. // *Biophys. J.* 2000. V. 78. P. 2752–2760.
35. Gsponer J., Ferrara P., Caflish A. // *J. Mol. Graph. Model.* 2001. V. 20. P. 169–182.
36. Ceruso M.A., Grottesi A., Di Nola A. // *Proteins*. 2003. V. 50. P. 222–229.
37. Koradi R., Billeter M., Wuthrich K. // *J. Mol. Graphics*. 1996. V. 14. P. 51–55.
38. Kabsch W., Sander C. // *Biopolymers*. 1983. V. 22. P. 2577–2637.
39. Guex N., Peitsch M.C. // *Electrophoresis*. 1997. V. 18. P. 2714–2723.

Correlation of Local Changes in the Temperature-Dependent Conformational Mobility of Thioredoxins with Their Thermostability

A. A. Polansky[#], Yu. A. Kosinsky, and R. G. Efremov

[#]Phone: +7 (095) 336-2000; e-mail: newant@nmr.ru
Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

For the development of a method for the prediction of single point mutations substantially affecting protein thermostability, we studied the effect of the E85R and R82E mutations on the thermostability of thioredoxins from *Escherichia coli* (Trx) and *Bacillus acidocaldarius* (BacTrx), respectively. The basic method of investigation was the molecular dynamics simulation of 3D protein models in a particular solvent at different temperatures (300 and 373 K). Some thermolabile regions in Trx, BacTrx, and their mutants were revealed by analyzing the temperature effect on the molecular dynamics of the protein molecule. The effect of single point mutations on the temperature changes of the protein conformation mobility in several thermolabile regions was found. The results of the calculations are in accord with the experimental data indicating that the mutation E85R increases Trx thermostability, whereas the mutation R82E decreases BacTrx thermostability. The thermostability of these proteins was revealed to depend on ionic interactions between the thermolabile regions. The single point mutations change the parameters of these interactions and make them more favorable in the E85R-Trx mutant and less favorable in the R82E-BacTrx mutant. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: ionic interactions, molecular dynamics simulation, protein flexibility, protein thermostability, single point mutations