

УДК 577.332

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АСПАРТОАЦИЛАЗЫ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Е.Д. Коц, М.Г. Хренова, С.В. Луцкекина, А.В. Немухин*

*(кафедра физической химии; *e-mail: anemukhin@yahoo.com)*

Результаты молекулярного моделирования позволяют связать каталитическую активность аспартоацилазы по отношению к гидролизу N-ацетил-аспартата с динамическими свойствами димерной молекулы фермента. Доступность активного центра фермента для субстрата контролируется конформационной динамикой пептидных петель, образующих ворота в транспортный канал в одном из мономеров. Показано, что данная модель объясняет результаты экспериментальных исследований, согласно которым мутация K213E не влияет на каталитическую функцию фермента.

Ключевые слова: ферментативный катализ, аспартоацилаза, гидролиз N-ацетил-аспартата, структура белка, молекулярная динамика, точечные мутации.

Повышенный интерес к исследованиям аспартоацилазы человека hAsp – фермента, ответственного за гидролиз N-ацетил-аспартата (НАА), важнейшего индикатора нейрональной дисфункции и гибели нейронов, объясняется тем, что при заболеваниях головного мозга различной природы (болезнь Канаван, болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, шизофрения) фиксируется нарушение концентрационного уровня НАА в тканях мозга [1]. Одной из возможных причин дисфункции hAsp у пациентов может быть наличие полиморфных модификаций фермента с одной или несколькими точечными мутациями в белковой макромолекуле. Выяснение молекулярного механизма действия фермента позволит предложить рациональную стратегию коррекции ферментативной активности hAsp на основе принципов персонализированной медицины.

Химическая реакция гидролиза НАА, состоящая из последовательности элементарных стадий превращений субстрата и интермедиатов и заканчивающаяся образованием пары аспарагиновой и уксусной кислот [2], происходит в активном центре фермента, расположенном внутри белковой глобулы. В данной работе, используя методы компьютерного моделирования, мы проверяли гипотезу [3] о роли структурных и динамических факторов, определяющих доступ субстрата к активному центру фермента, и следовательно, влияющих на каталитическую активность. Одна из задач моделирования состояла в выяснении роли точечной мутации K213E, выявленной у пациентов с болезнью Канаван [4]. Согласно экспериментальным данным, молекула hAsp реализуется в димерной форме. На рис. 1 изображена структура димера

hAsp, химически эквивалентные мономеры которого обозначены как ASPA и ASPB.

Полноатомные трехмерные модельные системы были построены на основе координат тяжелых атомов из банка данных белковых структур (PDB). Для природного фермента (wt-hAsp) была использована структура PDB ID 2O53 [5], а для мутанта (K213E hAsp) – структура PDB ID 4MXU [6]. В обоих случаях мы добавили в системы атомы водорода, поскольку традиционное состояние протонирования полярных аминокислотных остатков при нейтральных pH – положительно заряженные группы Lys, Arg и отрицательно заряженные группы Glu, Asp. Димеры белковых молекул были полностью погружены в водные оболочки так, чтобы расстояние от поверхности белка до границы ячейки составляло не менее 15 Å. Для нейтрализации общего заряда белка в системы были добавлены ионы натрия.

Для вычисления молекулярно-динамических (МД) траекторий модельных систем использовали компьютерную программу NAMD2.10 [7] с потенциалами силового поля CHARMM36 [8]. Расчеты проводили в каноническом ансамбле NPT с температурой 300 К и давлением 1 атм, шаг интегрирования 1 фс. Анализ продуктивных траекторий длиной не менее 40 нс проводили после необходимых процедур уравнивания систем.

Как показано на рис. 1, в каждом мономере и природного фермента, и мутанта можно выделить активный центр, включающий катион цинка, его координационную сферу, His21, Glu24, His116, молекулу воды и каталитически активный остаток Glu178 [2]. С поверхности белка к активному центру ведет транспортный канал, вход в который

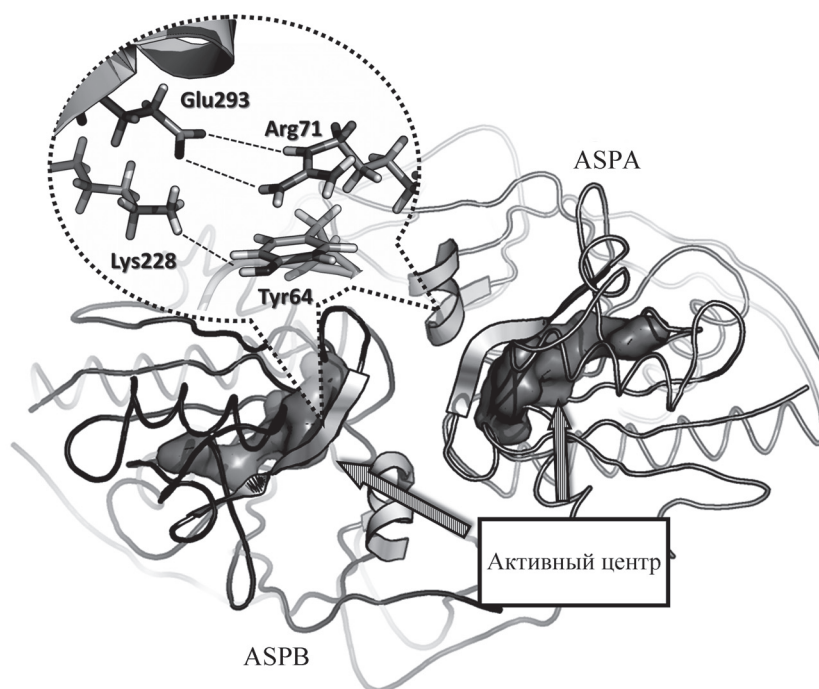


Рис. 1. Молекулярная модель димера hAsp, состоящего из мономеров ASPA и ASPB. Для каждого из мономеров показана область активного центра. «Ворота» в транспортный канал, контролирующее доступ субстрата в активный центр, показаны на врезке, обведенной пунктирной линией

контролируется аминокислотными остатками, расположенными на пептидных петлях 62–74 и 282–294 (указаны начальные и конечные номера остатков). Наиболее важные пары молекулярных групп, образующие своеобразные «ворота», составляют Arg71–Glu293 (солевой мостик из двух заряженных остатков) и Tyr64–Lys291.

Анализ молекулярно-динамических траекторий выявил важную особенность системы – динамические свойства мономеров в димере hAsp различны. В процессе динамики нарушается симметрия системы, и преобладают конформации, в которых у одного из мономеров (ASPB) «ворота» в активный центр преимущественно закрыты (т.е. петли 62–74 и 282–294 достаточно близки за счет коротких расстояний между аминокислотными остатками в парах Arg71–Glu293 и Tyr64–Lys291), а у другого мономера (ASPA) возможны конформации и с закрытыми, и с открытыми «воротами». Рис. 2 наглядно иллюстрирует эту особенность, показывая распределение расстояний между центрами масс тяжелых атомов основной цепи петель 62–74 и 282–294 для обоих мономеров wt-hAsp. Для мономера ASPB характерны конформации с близко расположенными петлями (закрытыми «воротами»), тогда как для мономера ASPA средние расстояния между петлями заметно больше. Эти результаты получены при расчетах серии МД-траекторий общей протяженностью 500 нс. Таким образом, экви-

валентность мономеров в кристаллической структуре димера [5] нарушается в процессе динамики димерного комплекса в водной среде. Проявления асимметрии в олигомерах белковых молекул, состоящих из химически идентичных мономеров, описаны в литературе [9], но в данном случае мы отмечаем значение именно динамического фактора, ответственного за нарушение симметрии.

Другая важная особенность модельных систем состоит в возможности сдвигать равновесие между конформациями лабильного мономера ASPA за счет аллостерических эффектов. Ранее было показано [10], что заселенность аллостерических сайтов связывания N-ацетил-аспартата на поверхности обоих мономеров способствует сдвигу равновесия в пользу конформаций с открытыми «воротами» и способствует увеличению скорости реакции гидролиза, а заселенность ингибирующего сайта связывания, расположенного на интерфейсе между мономерами димера, способствует сдвигу равновесия в пользу конформаций с закрытыми «воротами» и тем самым способствует уменьшению скорости реакции гидролиза.

В настоящей работе мы провели сопоставление динамических свойств димера природного белка (wt hAsp) и мутанта (K213E hAsp). Экспериментальные исследования [4, 6] полиморфного варианта K213E аспартоацилазы были инициированы клиническими результатами [4], свидетельству-

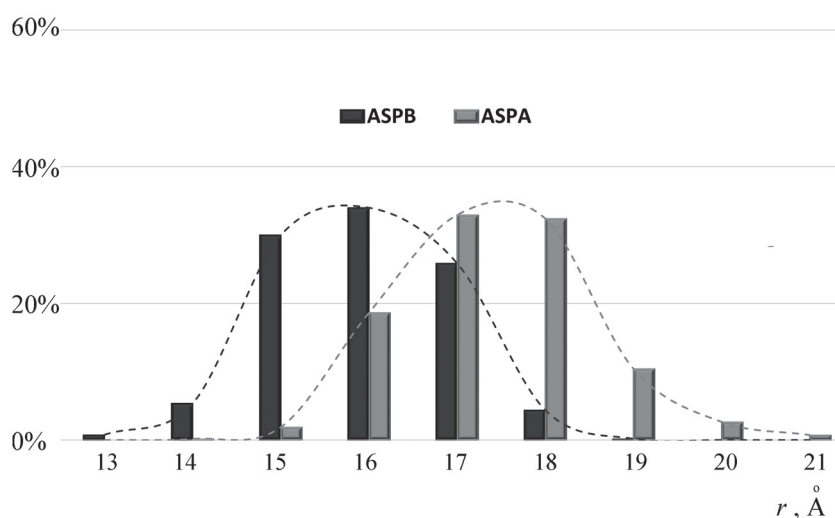


Рис. 2. Распределение расстояний между центрами масс тяжелых атомов петель 62–74 и 282–294 для мономера ASPB (черный цвет) и ASPA (серый цвет) для wt-hAsp вдоль молекулярно-динамических траекторий

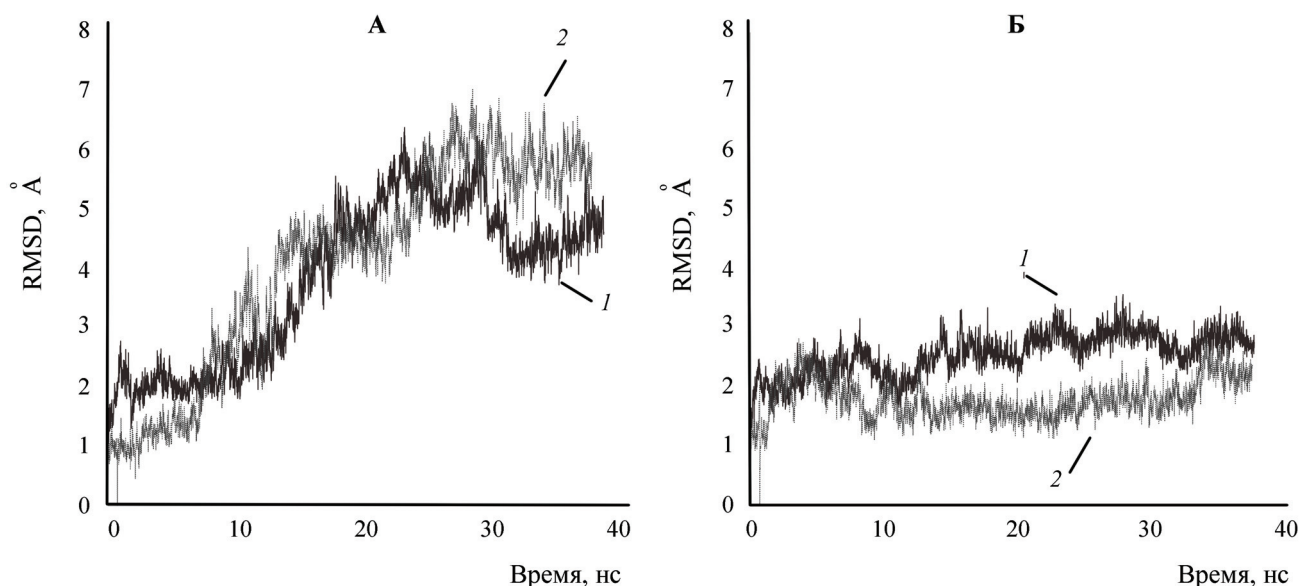


Рис. 3. Динамика петель, контролирующих вход в активный центр, для: 1 – природного фермента (wt-hAsp), 2 – мутанта (K213E hAsp). Данные по RMSD для мономеров: А – ASPA, Б – ASPB

ющими о присутствии двойной мутации K213E/G274R у пациентов с болезнью Канавана. В результате исследований *in vitro* было сделано неожиданное заключение: единичная замена K213E не сказывается на каталитической активности hAsp [4]. Дискуссия о влиянии точечных мутаций на функционирование аспартоцилазы проходит достаточно активно [4–6].

Анализ структурных особенностей димеров природного (wt-hAsp) и мутированного (K213E hAsp) ферментов показывает, что замена K213E не должна влиять на химические преобразования в активном центре, поскольку позиция 213 рас-

положена достаточно далеко от молекулярных групп, вовлеченных в процесс разрыва и образования химических связей при реакции гидролиза субстрата [2]. Напротив, динамические свойства фермента, ответственные за доступ субстрата в активный центр, могут быть модифицированы при замене положительно заряженного остатка Lys в позиции 213 на отрицательно заряженный остаток Glu.

На рис. 3 сопоставлены результаты расчетов МД-траекторий для природного фермента и мутанта, где в качестве начальных условий использовали координаты соответствующих кристалли-

ческих структур PDB ID 2O53 [5] и PDB ID 4MXU [6]. Данные по среднеквадратичным отклонениям (RMSD) для ключевых аминокислотных остатков Arg71, Glu293, Tyr64 и Lys291 показывают, что в мономере ASPB (рис. 3, Б) «ворота», контролирующие доступ субстрата в активный центр, закрыты, как и в кристалле. В мономере ASPA (рис. 3, А) по мере удаления от структуры кристалла расстояние между петлями увеличивается, раскрывая «ворота» в активный центр.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 14-13-00124).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moffett J.R., Ross B., Arun P., Madhavarao C.N., Namboodiri A.M.A. // *Prog. Neurobiol.* 2007. Vol. 81. P. 89.
2. Kots E.D., Khrenova M.G., Lushchekina S.V., Varfolomeev S.D., Grigorenko B.L., Nemukhin A.V. // *J. Phys. Chem. B.* 2016. Vol. 120. P. 4221.
3. Kots E.D., Lushchekina S.V., Varfolomeev S.D., Nemukhin A.V. // *J. Chem. Inf. Model.* 2017. Vol. 57. P. 1999.
4. Hershfield J.R., Pattabiraman N., Madhavarao C.N., Namboodiri M. A. A. // *Brain Res.* 2007. Vol. 1148. P. 1.
5. Le Coq J., Pavlovsky A., Malik R., Sanishvili R., Xu C., Viola R.E. // *Biochemistry.* 2008. Vol. 47. P. 3484.
6. Wijayasinghe Y.S., Pavlovsky A.G., Viola R.E. // *Biochemistry.* 2014. Vol. 53. P. 4970.
7. Phillips J.C., Braun R., Wang W., et al. // *J. Comput. Chem.* 2005. Vol. 26 P. 1781.
8. Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C., et al. // *J. Comput. Chem.* 2010. Vol. 31 P. 671.
9. Brown J.H. // *Protein Sci.* 2006. Vol. 15. P. 1.
10. Khrenova M.G., Kots E.D., Varfolomeev S.D., Lushchekina S.V., Nemukhin A.V. // *J. Phys. Chem. B.* 2017. Vol. 121. P. 9389.

Поступила в редакцию.09.01.18.

MECHANISMS OF REGULATION OF ASPARTOACYLASE CATALYTIC ACTIVITY BY RESULTS OF COMPUTER MODELING

E.D. Kots, M.G. Khrenova, S.V. Lushchekina, A.V. Nemukhin

(Division of Physical Chemistry and Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences; *e-mail: anemukhin@yahoo.com)

Results of molecular modeling demonstrate a relation of aspartoacylase catalytic activity with respect to hydrolysis of N-acetyl-aspartate to dynamical properties of the dimeric molecule of the enzyme. Availability of the enzyme active site for the substrate molecule is controlled by conformational dynamics of peptide chains forming a gate to the transport channel in one of the monomers. We demonstrate that this model explains the results of experimental studies showing that the point mutation K213E does not modify catalytic function of the enzyme.

Key words: enzyme catalysis, aspartoacylase, N-acetyl-aspartate hydrolysis, protein structure, molecular dynamics, point mutations.

Сведения об авторах: Коц Екатерина Дмитриевна – аспирант кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (kots.katya@gmail.com); Хренова Мария Григорьевна – вед. науч. сотр. лаборатории химической кибернетики кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. физ.-матем. наук (khrenova.maria@gmail.com); Луцкекина Софья Владимировна – ст. науч. сотр. Института биохимической физики РАН, канд. хим. наук (sofya.lushchekina@gmail.com); Немухин Александр Владимирович – профессор кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, лаборатория химической кибернетики, докт. хим. наук (anemukhin@yahoo.com).