

Тема работы: моделирование молекулярной динамики химозинов быка и верблюда, оценка влияния солевых мостиков на термостабильность химозина.

Состав коллектива:

инженер ЛСБиММ ФЕН НГУ, Новоселова Екатерина Сергеевна,
зав. ЛСБиММ ФЕН НГУ, к.б.н. Бакулина Анастасия Юрьевна,
зав. лаборатории, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор", к.б.н. Щербаков Дмитрий Николаевич

Информация о гранте:

РФФИ 17-44-220540 р_а: “Получение рекомбинантного химозина со сниженной термостабильностью и изучение его свойств”, рук. к.б.н. Щербаков Д.Н.

Научное содержание работы:

1. Постановка задачи

В представленной работе проводится расчет молекулярной динамики химозинов быка и верблюда с целью оценить вклад солевых мостиков в термостабильность исследуемых ферментов.

2. Современное состояние проблемы

На сегодняшний день создание ферментов с заданными свойствами является одним из основных направлений генной инженерии и биотехнологии. Важным для технологического и фармакологического использования ферментов является целый ряд определенных характеристик, в частности, одна из них — термостабильность. В ряде исследований было показано, что на термостабильность оказывают влияние: плотность упаковки гидрофобного ядра, количество солевых и дисульфидных связей, сила электростатических взаимодействий, длина и закрепление поверхностных петель, стабилизация спиралей, конформационная ригидность и локальная энтропия [Rahban, 2017, Vannen1 2008, Nestl 2014, Hendsch 1996, Manjunath 2013].

Для изучения факторов термостабильности предложен набор различных теоретических и экспериментальных методов. Так в ряде работ показано, что оценить термостабильность ферментов можно, например, с помощью компьютерного моделирования молекулярной динамики [Аксаринар 2015, Kumar 2015]. Данным методом можно определить наиболее чувствительные к температуре участки фермента и оценить вклад внутрибелковых взаимодействий, в частности, солевых мостиков, в сохранение конформации белка при нагревании. На основе полученных результатов в работе [Kumar 2015] делается предположение, о том, что более значимым для термостабильности фермента фитазы является локализация в определенном регионе солевых мостиков, а не их количество. Важность вклада солевых мостиков в термостабильность была также неоднократно показана и в экспериментально-теоретических работах [Bogin 2002, Rahban 2017].

Интересным с фундаментальной точки зрения и практически значимым для биотехнологии объектом для изменения температурной стабильности является фермент из класса гидролаз — химозин. Химозин – фермент, катализирующий гидролитическое расщепление пептидной связи между фенилаланином и метионином (в положении 105-106) основного белка молока каппа-казеина с образованием молочного сгустка [Fox, 1988]. Препараты химозина, полученные из желудка телят, используются в сыроварении для створаживания молока. Однако в настоящее время 80% рынка всего производимого химозина занимают препараты рекомбинантного химозина полученные методами генной инженерии. Было установлено, что рекомбинантный химозин верблюда, по сравнению с химозином теленка, демонстрирует повышение на 30% специфической активности по свёртыванию коровьего молока, при снижении общей протеолитической активности на 70% [Karpler и др, 2006]. Не смотря на это, современная технология производства сыров диктует определенные требования к ферменту, которые отсутствуют у верблюжьего химозина, одно из таких требований, способность необратимо денатурировать при определенной температуре, не превышающей технологические границы. Таким образом, сейчас существует острая необходимость создания новых рекомбинантных высокоэффективных химозинов с пониженной температурной стабильностью.

3. Подробное описание работы, включая используемые алгоритмы

В нашей работе с помощью пакета GROMACS 5.1.2. были рассчитаны и получены траектории молекулярной динамики химозинов теленка (PDB ID: 4AA8) и верблюда (PDB ID: 4AA9) (Рис. 1) при температурах 300, 350 и 400 К.

Для моделирования было использовано силовое поле AMBER99 и модель воды SPC. Предварительно были выполнены этапы минимизации энергии и релаксации модели.

Вариант последовательности химозина верблюда (PDB ID: 4AA9) содержит а.к.о. с 11 по 323. С помощью моделирования по гомологии на сервере ModWeb была построена модель пространственной структуры полного химозина верблюда (а.к.о. с 1 по 323). При моделировании молекулярной динамики химозина верблюда использовалась полученная структура. На рисунке 2 показано структурное выравнивание исходного (PDB ID: 4AA9) и смоделированного химозинов верблюда.

Белковая молекула химозина была первоначально растворена в водном кубическом боксе, так что минимальная дистанция между раствором и стенками бокса составляла 1 А. Оба атома азота в гистидиновых остатках химозина были заданы протонированными. рН ниже 6. В воду было добавлено восемь ионов Cl.

Минимизация энергии проводилась до тех пор пока максимальная сила взаимодействия не становилась меньше 1000 кДж/моль/нм. На первом этапе релаксации симуляция была запущена в NVT ансамбле длительностью 10 пс (5000 шагов при шаге моделирования 2 фс). Затем был выполнен второй этап релаксации модели в NPT ансамбле длительностью 25 пс (5000 шагов при шаге

моделирования 5 фс). Основное моделирование было выполнено при постоянном давлении (баростат Паринелло-Рахмана) длительностью 5 нс (25000 шагов при шаге моделирования 2 фс). Всего было выполнено три запуска моделирования молекулярной динамики химозина теленка и верблюда при температурах 300, 350 и 400 К.

Для каждого запуска моделирования молекулярной динамики было рассчитано RMSD атомов химозина (Рис. 3). Сравнение графиков RMSD при температурах 300, 350 и 400 К показывает, что подвижность атомов тем выше, чем выше заданная температура. Однако, различия между кривыми не настолько велики, чтоб говорить о том, что произошла денатурация белка при повышении температуры до 400 К.

С помощью плагина Salt Bridges программы VMD 1.9.2. был проведен анализ изменения солевых мостиков в химозине теленка и верблюда при изменении температуры. Взаимодействие идентифицировалось как солевой мостик в том случае, если атомы азота и кислорода в удаленных аминокислотных остатках сближались на расстояние не превышающее 4 Å во время моделирования. Были отобраны солевые мостики персистентность или время жизни которых составляло более 50% от всего времени моделирования хотя бы при одной температуре. Было рассчитано среднее расстояние между атомами кислорода и азота каждого идентифицированного солевого мостика за все время моделирования.

4. Полученные результаты

В таблицах 1 и 2 представлены отобранные солевые мостики в химозине теленка и химозине верблюда.

Таблица 1. Предсказанные солевые мостики в химозине теленка.

Мостик		300 К		350 К		400 К	
		персистен тность	средняя длина (Å)	персистен тность	средняя длина (Å)	персистен тность	средняя длина (Å)
1	ASP300-ARG304	0.60%	5.753	75.94%	3.916	18.32%	4.592
2	GLU305-LYS321	50.07%	4.801	28.26%	5.693	65.05%	4.176
3	ASP59-ARG61	99.90%	3.455	44.98%	4.656	76.29%	4.898
4	GLU28-LYS19	66.70%	3.787	73.94%	3.813	70.54%	3.983
5	GLU290-HIS292	70.24%	3.981	12.78%	4.999	12.23%	4.982
6	GLU245-LYS221	87.82%	3.836	9.39%	6.506	0%	12.025
7	GLU305-ARG159	78.63%	4.352	61.21%	4.325	36.40%	4.647
8	ASP98-ARG145	43.53%	4.074	40.09%	4.997	96.16%	3.526
9	ASP140-ARG312	0.30%	4.452	4.09%	4.327	99.55%	3.436
10	ASP151-HIS146	13.03%	5.616	20.27%	7.782	50.37%	4.538

Таблица 2. Предсказанные солевые мостики в смоделированном химозине верблюда.

Мостик		300 К		350 К		400 К	
		персистен тность	средняя длина (А)	персистен тность	средняя длина (А)	персистен тность	средняя длина (А)
1	ASP300-ARG304	6.29%	4.409	45.33%	4.302	98.85%	3.502
2	GLU305-LYS321	10.28%	6.309	47.98%	4.166	64.75%	4.464
3	ASP59-ARG61	85.77%	3.662	97.70%	3.489	52.62%	4.843
4	GLU28-LYS19	69.50%	4.096	79.78%	3.775	60.66%	4.168
5	ASP120-HIS56	81.93%	3.923	0.05%	4.942	89.82%	3.832
6	ASP228-LYS232	52.92%	4.653	34.20%	6.028	49.83%	4.768
7	GLU305-ARG159	87.87%	3.681	47.98%	4.168	75.09%	3.867
8	ASP98-ARG145	79.68%	3.843	99.80%	3.483	57.11%	4.150
9	ASP140-ARG312	5.04%	4.331	99.95%	3.425	20.17%	4.221
10	ASP151-HIS146	49.53%	4.864	78.93%	4.233	35.70%	5.788

Зеленым цветом в таблице обозначены уникальные для каждого химозина солевые мостики.

В химозине теленка были выделены солевые мостики средняя длина и персистентность которых не зависели значительно от температуры (GLU28-LYS19). Можно предположить, что данные солевые мостики вносят наибольший вклад в стабилизацию структуры химозина. К другой группе были отнесены температур-чувствительные мостики среди которых были такие, персистентность которых как понижалась с повышением температуры (GLU290-HIS292, GLU245-LYS221, GLU305-ARG159), так и повышалась (ASP151-HIS146, ASP140-ARG312, ASP98-ARG145). Наиболее вероятно, что мостики с тенденцией повышения персистентности при повышенной температуре вносят наиболее значимый вклад в термостабильность фермента, так как образование новых и укрепление имеющихся связей при нагревании предохраняет белок от денатурации. Таким образом, аминокислоты, входящие в мостики последней группы являются наиболее подходящей мишенью для искусственных мутаций, приводящих к снижению термостабильности химозина. В таблице 3 указаны предлагаемые замены.

Был проведен анализ консервативности предложенных позиций аминокислот с помощью множественного выравнивания ста наиболее гомологичных последовательностей химозинов в Standard Protein BLAST. Анализ полученного множественного выравнивания химозинов был выполнен с помощью программы SeaView 4. Консервативные позиции предлагается заменить на нейтральные аминокислоты.

Таблица 3. Таблица предложенных замен

№	а.к.о. в химозине быка	предлагаемая замена	номер в последовательности fasta	номер в файле pdb
1	ASP	VAL	156	98
2	GLU	консервативный*	363	305
3	ASP	консервативный*	209	151
4	ASP	консервативный*	198	140

*Консервативный – обозначает, что во множественном выравнивании не было замен этого остатка.

Ранее было показано, что заряд поверхности верблюжьего химозина выше по сравнению с бычьим (Рис. 4), что в результате сказывается на повышенной активности верблюжьего фермента.

Анализ парного выравнивания химозинов быка и верблюда действительно показал, что в верблюьем химозине существует ряд замен нейтральных на положительно заряженные аминокислоты. Данные позиции также являются перспективными для замен с точки зрения повышения эффективности фермента (см. Таблицу 4).

Таблица 4. Таблица предложенных замен

№	а.к.о. в химозине быка	предлагаемая замена	номер в последовательности fasta	номер в файле pdb
1	GLN	LYS	336	278
2	GLN	LYS	289	231
3	GLN	ARG	125	67
4	GLN	ARG	208	150
5	SER	ARG	312	254

5. Иллюстрации, визуализация результатов

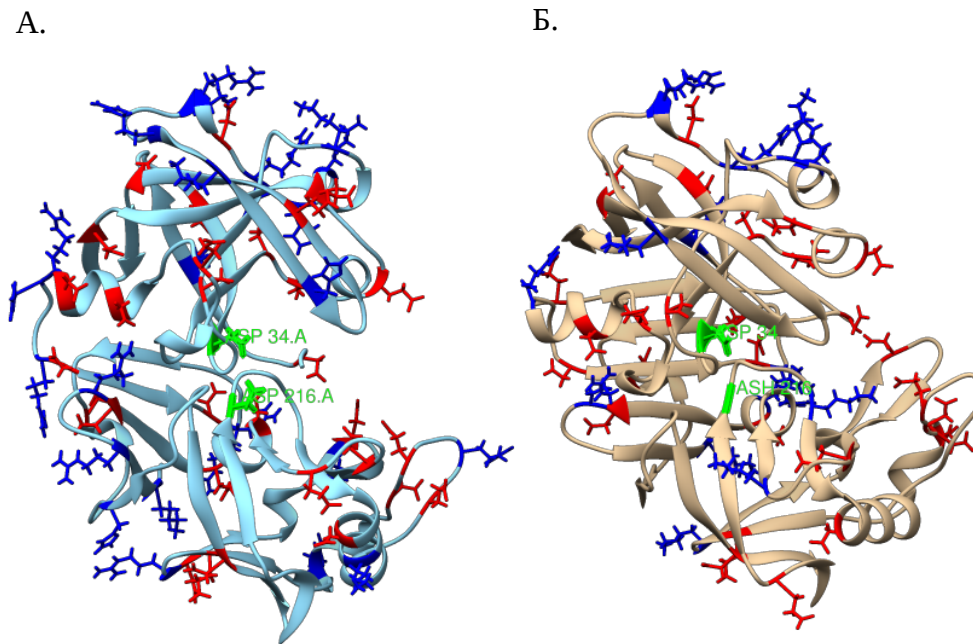


Рисунок 1. Пространственные структуры химозинов телянка (PDB ID: 4AA8) (А.) и верблюда (PDB ID: 4AA9) (Б.). Зеленым обозначены аминокислотные остатки, входящие в каталитический центр. Красным обозначены положительно заряженные аминокислоты, синим — отрицательно заряженные.



Рисунок 2. Структурное выравнивание исходного (PDB ID: 4AA9) (голубой) и смоделированного с помощью ModWeb (серый) химозинов верблюда. Зеленым обозначены добавленные 10 а.к.о.

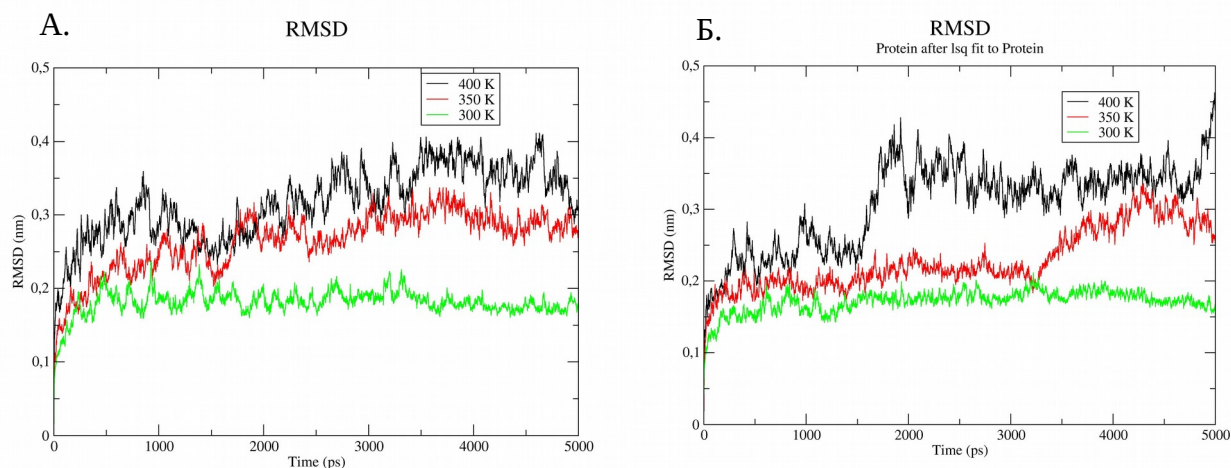


Рисунок 3. Среднеквадратичное отклонение атомов белка (RMSD) посчитанное для молекулярной динамики химозина быка (А) и верблюда (Б).

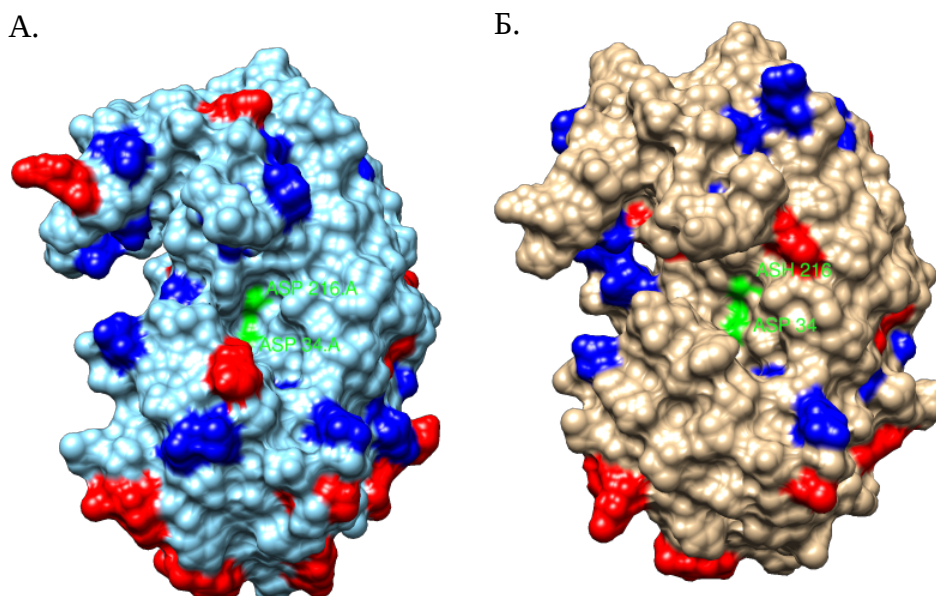


Рисунок 4. Распределение зарядов на поверхности химозина быка (А.) и верблюда (Б.). Синим обозначены отрицательно заряженные области, красным — положительно заряженные области. Зеленым обозначены аминокислоты активного центра.

6. Эффект от использования кластера в достижении целей работы

Расчет траекторий молекулярной динамики ферментов требует значительных вычислительных мощностей и на персональном компьютере занимает продолжительное время (до нескольких недель). Использование кластера значительно ускорило время расчетов и стало определяющим для успешного достижения цели работы.