

1 Аннотация

Посредством молекулярно-динамических расчетов в программном пакете GROMACS было выполнено моделирование диоксигеназы ALKBH2 человека дикого типа и её мутантных форм Y112A, I168A, D173A, R110A, R172A, E175A в комплексе с ДНК, содержащей 3-метилцитозин или 1-метиладенин. Результаты моделирования структуры фермент-субстратного комплекса, содержащего замены аминокислотных остатков в активном центре фермента позволяют, вместе с экспериментальными результатами, точнее охарактеризовать механизм действия фермента.

2 Тема работы

Моделирование мутантных форм диоксигеназы ALKBH2, содержащих замены аминокислотных остатков активного центра фермента.

3 Состав коллектива

Давлетгильдеева Анастасия Тимуровна, к.х.н., м.н.с., ИХБФМ СО РАН, руководитель;

Тюгашев Тимофей Евгеньевич, в. инж., ИХБФМ СО РАН, исполнитель.

Чжао Минсин, аспирант ИХБФМ СО РАН, исполнитель.

4 Информация о гранте

РНФ № 21-14-00018 «Кинетические аспекты превращения фермент-субстратных комплексов в процессах деметилирования ДНК» Кузнецова А.А. 2020-2023

5 Научное содержание работы

5.1 Постановка задачи

Фермент ALKBH2, выполняющий окислительное деметилирование азотистых оснований, способен удалять алкилированные повреждения ДНК m^1A , m^3C и эпигенетические метки m^5C . С целью установления роли отдельных аминокислотных остатков R110, Y122, I168, R172, D173, E175 в активном центре ALKBH2 в механизме распознавания субстратов фермента, вместе с экспериментальной характеристикой мутантных форм фермента, содержащих соответствующие аланиновые замены, требуется также и проведения молекулярно-динамического моделирования структур фермент-субстратных комплексов.

5.2 Современное состояние проблемы

ABH2 является одним из первых идентифицированных человеческих гомологов в семействе диоксигеназ AlkB, использующих негемовое железо в качестве кофактора и α -кетоглутарат (α -KG) в качестве ко-субстрата, активизируя O_2 молекул для прямого катализа окислительной репарации, устраняя повреждение алкилирования [1,2]. В активном центре Fe^{2+} через координационную связь связывается с поверхностным триплетом, состоящим из двух гистидинов (H171, H236) и одной аспарагиновой кислоты (D173), сайтами связывания с

α -KG являются Asn159, Tyr161, Arg248, Thr252 и Arg254, в то же время α -KG также связан с Fe^{2+} в бидентатном режиме [3,4,5].

На данный момент подтверждено, что 8 типов повреждений основания являются субстратами ALKBH2, а именно: 1-метиладенин (m^1A), 3-метилцитозин (m^3C), 5-метилцитозин (m^5C), 3-метилтимин (m^3T), N^3 -этилтимидин ($N^3\text{-EtT}$), 1, N^6 -этенoadенин (ϵA), 3, N^4 -этенoцитозин (ϵC), 1, N^2 -этенoгуанин (1, N^2 - ϵG), показано на рис. 5. По сравнению с ионами металлов и ко-субстратом α -KG, ALKBH2 имеет более высокое сродство к своему субстрату [6]. Исследование показано, что скорость репарации ABH2 к m^1A выше, чем к m^3C , m^1A является лучшим субстратом ABH2 [6]. m^5C является важным эпигенетическим маркером у млекопитающих, недавняя работа показала, что ABH2 может последовательно окислять m^5C до 5- гидроксиметилцитозина (hm^5C), 5-формилцитозина (f^5C) и 5- карбоксицитозина (ca^5C), основным продуктом репарации является hm^5C [7]. Следовательно, окислительное деметилирование m^5C с помощью ABH2, вероятно, является дополнительным путем для контроля эпигенетической модификации [8].

Кристаллическая структура комплекса ABH2 с ds-ДНК указывает на то, что данный белок может взаимодействовать с двумя цепями ds-ДНК, он использует гидрофобную шпильку (V101-F102-G103) выворачивать поврежденное основание в активный центр фермента, а пальцевидный остаток F102 заполнит свободное пространство, оставленное выворотом основания, и сложится с соседними основаниями [2,9].

Вывернутое основание связывается с Y122, F124 и S125 в «крышке распознавания нуклеотидов (NRL)», среди них S125 связывается с 5'-фосфатом нуклеотида вывернутого основания, играя важную роль в эффекте репарации ss-ДНК; Y122 вступает в прямой контакт с основаниями m^1A и m^3C ; остатки F124 и H171 образуют π - π стэкинг с азотистым основанием с обеих сторон, а остатки R110 и R172 связаны соответственно с 5'-фосфатами соседних нуклеотидов по обе стороны от поврежденного основания; связывание этих аминокислотных остатков с субстратом помогает прочно закреплять поврежденное основание внутри активного центра и способствует окислению алкильной модификации [9,10,11]. Установлено, что стенка кармана поврежденного основания образована V99, R110, S125 и I168. Остаток E175 в активном центре взаимодействует с экзоциклической аминогруппой поврежденного основания, что может быть причиной того, что повреждения в основаниях A и C легче восстанавливаются [11].

ABH2 является основным ферментом «домашнего хозяйства», который защищает геном млекопитающих от повреждения основаниями m^1A , и имеют потенциальную роль в эпигенетической регуляции [1]. ABH2 мутирован и aberrантно экспрессируется при разных видах рака человека, он обладает большим потенциалом в качестве диагностического

маркера опухоли и потенциальной терапевтической мишени [12]. Таким образом, очень важно изучить влияние мутантов аминокислот с функциональной активностью в активном центре на способность восстанавливать поврежденные основания.

- 1 Yi C, et al. Acc Chem Res. 2009, 42, 4.
- 2 Yi C, et al. Nat Struct Mol Biol. 2012, 19, 7.
- 3 Xu B, et al. Cell Mol Life Sci. 2021, 78, 1.
- 4 Giri NC, et al. Biochemistry. 2011, 50, 22.
- 5 Waheed SO, et al. ACS Cent Sci. 2020, 6, 5.
- 6 Kanazhevskaya LY, et al. Molecules. 2022, 27, 15.
- 7 Bian K, et al. Nucleic Acids Res. 2019, 47, 11.
- 8 Kuznetsov NA, et al. Int J Mol Sci. 2021, 22, 19.
- 9 Chen B, et al. Mol Biosyst. 2010, 6, 11.
- 10 Chen, B., et al. Science China Chemistry. 2014, 57, 2.
- 11 Lenz SAP, et al. DNA Repair (Amst). 2020, 96.
- 12 Ougland R, et al. J Mol Cell Biol. 2015, 7, 6.

5.3 Подробное описание работы

Рентгеновская кристаллическая структура существующего комплекса ALKBH2-dsДНК использовалась для подготовки к моделированию. Кристаллическая структура уже содержит кофактор Mn^{2+} Fe-мимизирующий ион и косубстратный α -кетоглутарат, для базовой модификации m^1A мы выбрали кристаллическую структуру с PDB ID 3BUC, а для m^3C – 3RZJ [1,2]. Были восстановлены неразрешенные и модифицированные для кристаллизации аминокислотные остатки с помощью Modeller [3], последовательность связанной ДНК была модифицирована соответственно используемой в экспериментах. Состояние протонирования ионизируемых боковых цепей оценивали с помощью H⁺⁺-сервера [4].

Настройка моделирования и моделирование были выполнены с использованием пакета GROMACS MD [5]. Моделируемая система помещена в додекаэдрический бокс PBC, расстояние между боксом и поверхностью белка не менее 10 Å, и модельная вода TIP3P использована в моделируемой системе, и 50 mM ионов KCl JC добавлено к растворителю для нейтрализации положительных и отрицательных ионов в системе, таким образом устанавливая исходную структуру [6,7]. Силовое поле AMBER 14SB с поправками OL15 использовано для описания белка и ДНК-субстрата [8-11]. Параметры силового поля α -KG и субстратов (m^1A , m^3C) генерированы модулем Antechamber Amber 16, при этом заряды RESP рассчитывано сервером REDD [12-16]. Преобразование в GROMACS-совместимые форматы выполнено с помощью инструмента ACPYPE [17]. Ион Fe^{2+} активного центра был смоделирован как несвязанная катионная фиктивная модель [18]. Центр Fe^{2+} находится в высокоспиновом состоянии ($S = 2$, $M = 5$); параметры металлического центра получены на основе методов соединения и электростатического моделирования. Лиганды связаны с металлом через координационную связь, в том числе связываются с α -KG в бидентатной

форме и дополнительно связываются с поверхностными триплетными аминокислотными остатками (H171, H236, D173), остаткам гистидина, координированным с центром Fe^{2+} , были присвоены состояния протонирования на основании визуального осмотра их локального окружения.

Перед моделированием MD алгоритм минимизации наискорейшего спуска выполнял 50 000 шагов минимизации энергии для всей системы в вакууме, чтобы исключить слишком тесные контакты между атомами, значение сходимости минимизации энергии составляло $1000 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{нм}^{-1}$, пороговое значение Ван-дер-Ваальса взаимодействия (vdW) устанавливалось равным $10 \text{ \AA}$, а взаимодействие на большие расстояния рассчитывалось с использованием метода PME (Particle-mesh Ewald) [19,20]. Все ковалентные связи с участием атомов водорода были ограничены с помощью LINCS solver [21]. После завершения энергетической оптимизации всей системы температура линейно увеличивалось от 0 до 310 К в каноническом ансамбле (NVT) с помощью термостата V-rescale, давление в системе изменялось, а количество атомов, объем системы и температура поддерживалось постоянными, чтобы сбалансировать систему в течение 500 пс, а размер шага установлен равным 2 фс. После уравнивания NVT система уравнивалась при постоянном давлении, постоянной температуре (NPT) в течение 1 нс при фиксированной температуре (310 К) и давлении (1 бар), а время связи при постоянном давлении составляло 2 пс, размер шага был установлен равным 2 фс, а давление поддерживалось постоянным с помощью баростата Parrinello-Rahman [23]. Моделирование MD без ограничений после уравнивания проводилось в течение 250 нс, конформация сохранялась каждые 50 пс, и моделирование повторялось 3-4 раза. Обработка траекторий выполнялась с использованием интегрированного набора инструментов GROMACS в сочетании с программой Mdttra (Molecular Dynamics Trajectory Reader & Analyzer) для структурного анализа траекторий MD. Визуализация результатов моделирования осуществляется в открытой версии программы просмотра PyMOL.

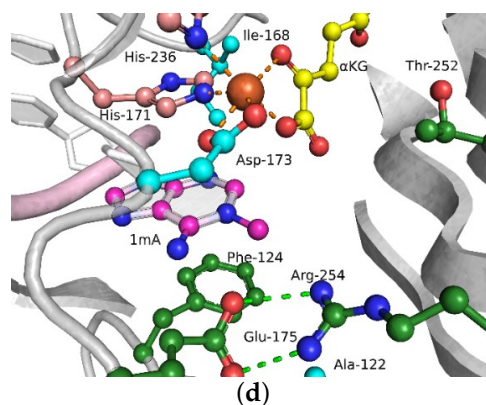
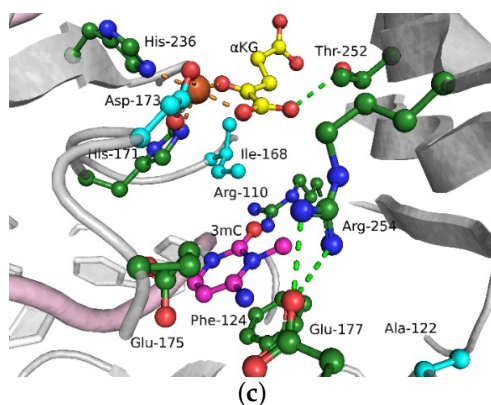
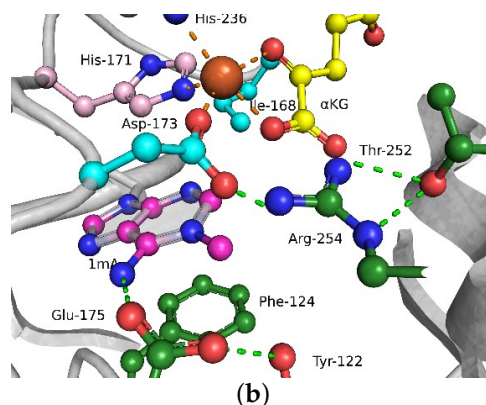
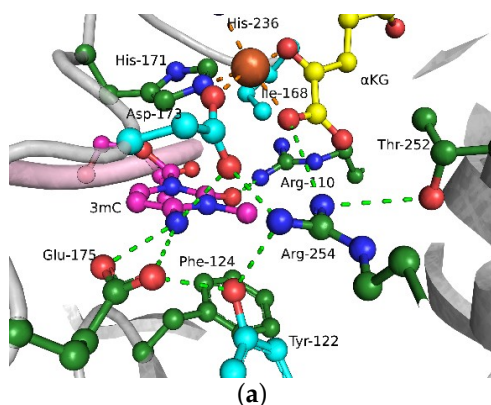
- 1 Yang C.-G., et al. Nature, 2008, 452, 7190.
- 2 Yi C., et al. Nature Structural & Molecular Biology, 2012, 19, 7.
- 3 Šali. Rockefeller University, 2013.
- 4 Anandakrishnan R., et al. Nucleic Acids Research, 2012, 40, H++ 3.0.
- 5 Abraham M.J., et al. SoftwareX, 2015, 1-2, GROMACS.
- 6 Jorgensen W.L., et al. The Journal of Chemical Physics, 1983, 79.
- 7 Joung I.S., et al. The Journal of Physical Chemistry B, 2008, 112 30.
- 8 Cornell W.D., et al. Journal of the American Chemical Society, 1995, 117, 19.
- 9 Maier J.A., et al. Journal of Chemical Theory and Computation, 2015, 11, 8.
- 10 Zgarbová M., et al. Journal of Chemical Theory and Computation, 2011, 7, 9.
- 11 Zgarbová M., et al. Journal of Chemical Theory and Computation, 2015, 11, 12.
- 12 Bayly C.I., et al. The Journal of Physical Chemistry, 1993, 97, 40.
- 13 Wang J., et al. Journal of Computational Chemistry, 2004, 25, 9.

- 14 Wang J., et al. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2006, 25, 2.
- 15 Meagher K.L., et al. Journal of Computational Chemistry, 2003, 24, 9.
- 16 Vanquelef E., et al. Nucleic Acids Research, 2011, 39.
- 17 Sousa da Silva A.W., et al. BMC Research Notes, 2012, 5, 1.
- 18 Jiang Y., et al. Journal of Chemical Theory and Computation, 2016, 12, 7.
- 19 Essmann U., et al. The Journal of Chemical Physics, 1995, 103, 19.
- 20 Wennberg C.L., et al. Journal of Chemical Theory and Computation, 2013, 9, 8.
- 21 Hess B., et al. Journal of Computational Chemistry, 1997, 18, 12.
- 22 Berendsen H J C, et al. Journal of Chemical Physics, 1984, 81, 8.
- 23 Parrinello M., et al. Journal of Applied Physics, 1981, 52, 12.

5.4 Полученные результаты

MD-моделирование мутантных форм фермента

Функции аминокислотных остатков Tyr122, Ile168 и Asp173 в распознавании повреждений оценивали с помощью MD-моделирования. Смоделированы комплексы диких (рис. 1А, В) и мутантных форм АВН2 Y122А (рис. 1С, D), I168А (рис. 1Е, F) или D173А (рис. 1G, H) с ДНК, содержащей m¹A или m³C, для анализа конформационных перестроек, вызванных аминокислотной заменой.



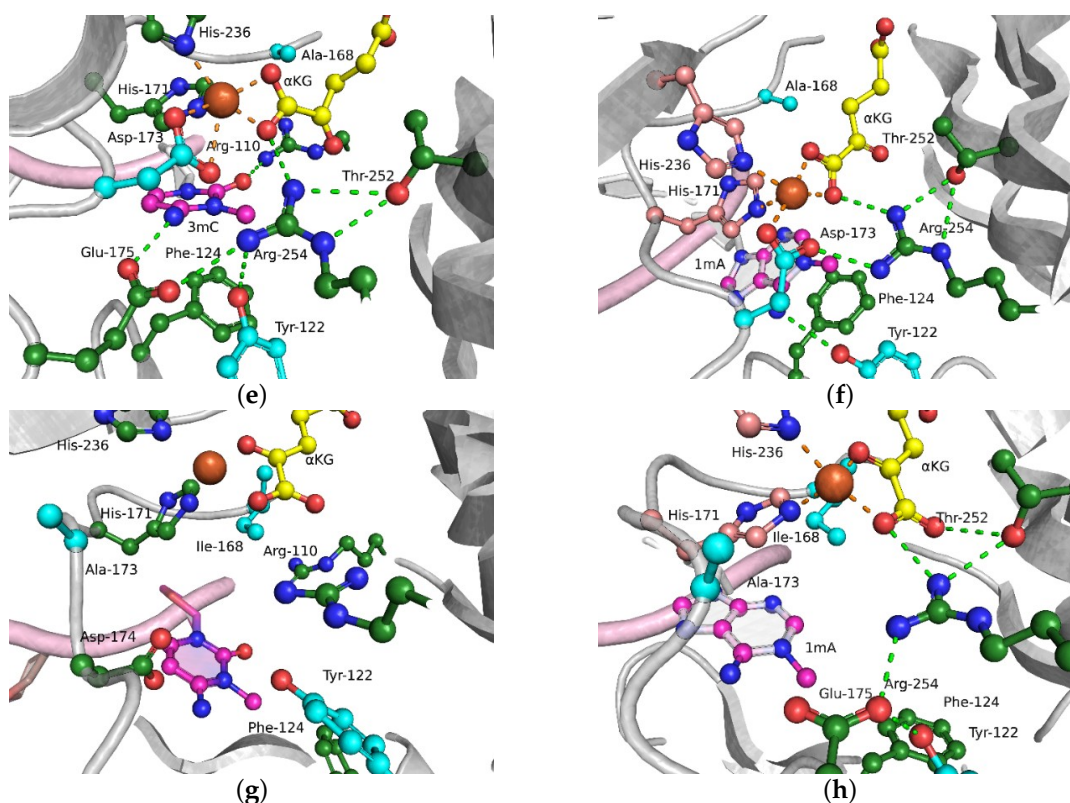


Рис. 1. Крупный план рабочей области распознавания повреждений m^3C (а, с, е, г) и m^1A (b, d, f, h) в активном сайте WT ABH2 (а, b) или его мутантных форм Y122A (с, d), I168A (е, f) или D173A (g, h), как определено моделированием MD.

Полученная MD-модель Y122A (рис. 1 с, d) показала, что замена Tyr122 вызывает потерю водородной связи с Arg254 и исчезновение солевого мостика Arg254–Asp173, это важно для координации иона Fe^{2+} в активном центре с помощью Asp173. Такая дестабилизация положения иона Fe^{2+} нарушает координационную сферу иона металла и, скорее всего, должна влиять на каталитическую эффективность.

Замена I168A (рис. 1 е, f) приводит к расширению кармана активного центра, что позволяет молекуле αKG двигаться, вращаться и взаимодействовать с ионом Fe^{2+} только через карбоксильную группу. Следовательно, каталитическая активность ABH2 I168A, скорее всего, низкая из-за каталитически «неправильного» положения αKG .

В случае D173A (рис. 1 g, h) укладка поврежденных оснований с остатком Phe124 нарушена из-за другого положения нуклеотида-мишени. Более того, недовыворачивание обоих испытанных поврежденных оснований приводит к большей их подвижности в кармане активного центра. Хотя конформация ДНК несовершенна для каталитического состояния, ион Fe^{2+} сохраняет свое каталитически компетентное положение за счет дополнительной молекулы воды вместо Asp173.

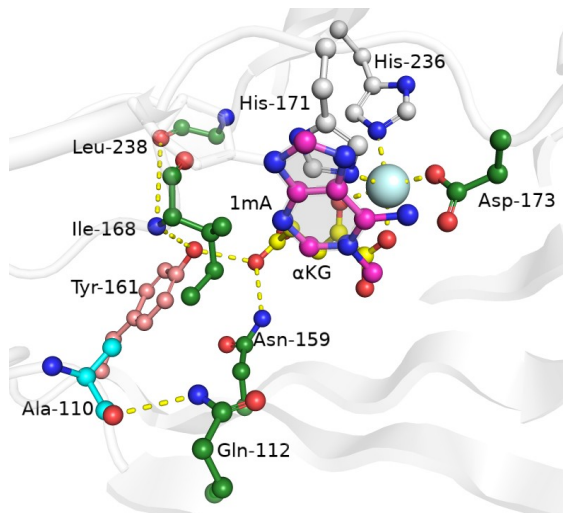
Влияние мутантов R110A, R172A, E175A на связывание важных аминокислотных остатков в активном центре с ДНК-субстратами

В случае замены R110A, в комплексах с ДНК-субстратами, содержащими оба повреждения (m^1A и m^3C), наблюдалось, что остатки I168, и Q112 располагались в пространстве, образованном после замены объемного остатка аргинина на аланин (рис. 2 а, б). Кроме того, взаимодействие водородных связей между гидроксильной группой Y161 и O51 кетоглутарата у мутанта вдвое меньше, чем у дикого типа.

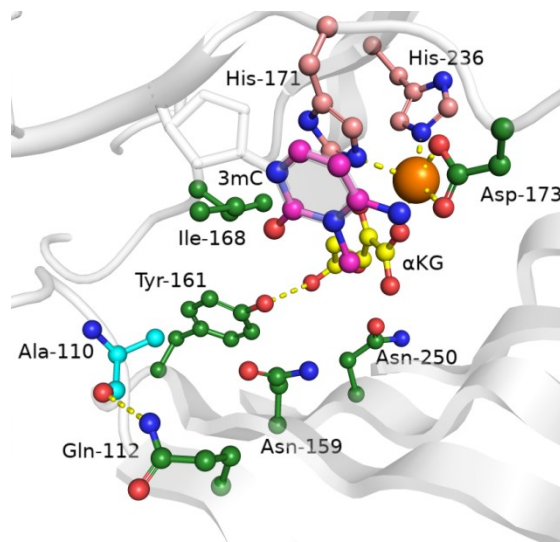
В случае замены R172A, остаток K200 встраивался в свободное пространство, заменяя R172 и образуя контакт с карбоксильным атомом кислорода основной цепи N231, а также взаимодействуя с атомом кислорода боковой цепи D174 за счет водородной связи (рис. 2 с, d), это указывает на то, что после мутации R172 до меньшего аланин, A172 с большей вероятностью «захвачен» D174.

При замене E175A, и результаты молекулярно-динамического моделирования показаны, что помимо прямой потери взаимодействия с экзоциклической аминогруппой поврежденного основания, остатки F124 и Y122 имеют значительные позиционные сдвиги, приводящие к тому, что F124 не образует стэкинг с поврежденными азотистыми основаниями (рис. 2 е, f), именно из-за потери водорода связи между E175 и Y122, что F124 и Y122 находятся в более свободном состоянии.

(a)



)



(b)

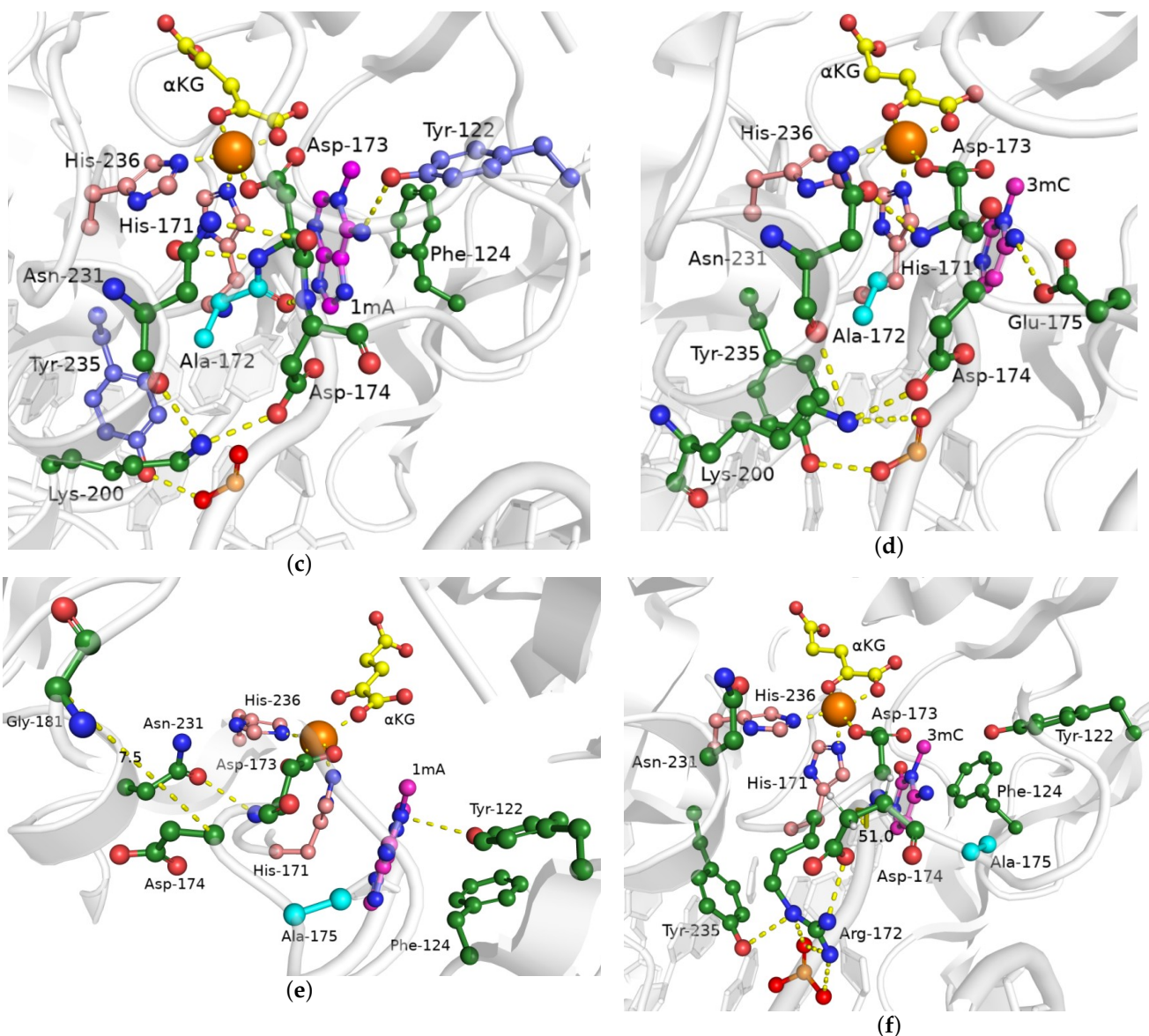


Рис. 2. Крупный план рабочей области распознавания повреждений m^1A (a, c, e) и m^3C (b, d, f) в активном сайте мутантных форм R110A (a, b), R172A (c, d) или E175A (e, f), как определено моделированием MD.

6 Эффект от использования кластера в достижении целей работы

Молекулярно-динамические расчеты такого объема требуют использования производительного вычислительного кластера.

7 Публикации

Davletgildeeva, A., Tyugashev, T., Zhao, M., Kuznetsov, N., Ishchenko, A., Saparbaev, M., Kuznetsova, A., 2023. Individual Contributions of Amido Acid Residues Tyr122, Ile168, and Asp173 to the Activity and Substrate Specificity of Human DNA Dioxygenase ABH2. Cells 12, 1839. <https://doi.org/10.3390/cells12141839>

В процессе подготовки две статьи, характеризующие мутантные формы V99A, F124A, S125A, R110A, R172A, E175A