

КОМПЬЮТЕРНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ТОЧЕЧНОГО МУТАГЕНЕЗА ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 ЧЕЛОВЕКА С ЦЕЛЮ ПОВЫШЕНИЯ ЕГО ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ

© 2016 г. М.С. Кондратьев, А.В. Кабанов, М.Г. Холявка*, М.Г. Шарапов, Н.Н. Хечинашвили

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3;

*Воронежский государственный университет, 394006, Воронеж, Университетская площадь, 1

E-mail: ma-ko@bk.ru

Поступила в редакцию 06.11.15 г.

Приводится алгоритм повышения термостабильности глобулярного антиоксидантного фермента пероксиредоксина 6 человека, рекомбинантная форма которого была создана путем анализа аминокислотного состава фермента крысы (*Rattus rattus*). Исползованная в работе оригинальная концепция повышения термостабильности малых глобулярных белков за счет использования альтернативного водородного связывания периферических кислых и основных аминокислотных остатков существенно дополнена результатами молекулярно-динамического моделирования на графических процессорах.

Ключевые слова: пероксиредоксин 6 человека, термостабильность, молекулярная динамика, биоинженерия, точечные мутации, ферменты.

Получение биомакромолекул с необходимыми свойствами является одной из важнейших задач современной биоинженерии [1], причем очень часто проблема сводится к поиску способов увеличения термостабильности биокатализаторов (ферментов). Высокая термостабильность ферментов позволяет не только расширить сроки хранения препаратов, но и значительно увеличить скорость энзиматического катализа, и добиться экономического эффекта при сокращении стадий охлаждения субстратов.

Несколько лет назад в лаборатории структуры и динамики биомолекулярных систем ИБК РАН был предложен весьма элегантный подход к повышению термостабильности малых глобулярных белков путем обоснованного увеличения количества альтернативных водородных связей между боковыми группами заряженных аминокислотных остатков на поверхности глобулы. Гипотеза, лежащая в основе указанной методики, была исходно основана на результатах экспериментов [2]. Позднее авторы существенно дополнили ее сравнительным моделированием молекулярной динамики малых белков из термофильных и мезофильных организмов [3,4].

В настоящей работе развиваемые представления применены для повышения термостабильности антиоксидантного фермента пероксиредоксина 6 человека (рис. 1). Данный белок был

открыт и описан [5] в ИБК РАН и является достаточно перспективным для терапевтических целей – при условии повышения его термостабильности. Ранее была установлена пространственная структура фермента (код pdb: 1PRX) [6], а также выделены его гомологи из различных организмов. Термодинамические характеристики данных белков были хорошо изучены нашими коллегами [7]. Однако для осмысленного внесения точечных мутаций в первичную последовательность этого белка представляется важным сначала оценить эффективность таких планируемых замен в условиях различного микроокружения – путем полноатомного моделирования динамического поведения этого антиоксидантного фермента.

МЕТОД

Структура рекомбинантного пероксиредоксина 6 человека была предложена на основе результатов выравнивания аминокислотных последовательностей известных гомологов этого белка, с учетом описанной выше концепции альтернативного водородного связывания. Нативный фермент человека, фермент крысы (он наиболее близок по гомологии и демонстрирует высокую термостабильность), а также предлагаемый рекомбинантный белок были изучены при помощи методов молекулярной динамики

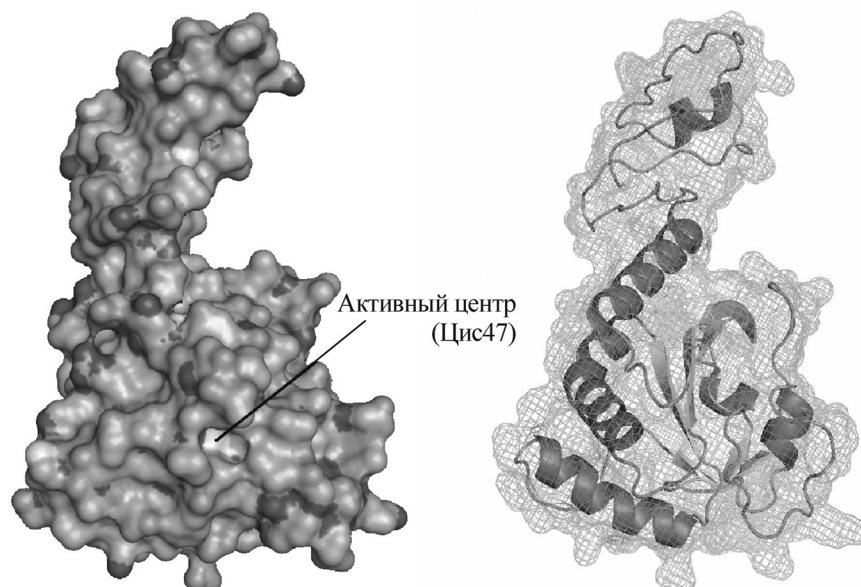


Рис. 1. Структура пероксиредоксина-6 человека (код pdb: 1PRX) с указанием активного центра фермента.

с использованием техники распараллеленных вычислений на графических процессорах. Стоит отметить, что в последнее время исследователи, занимающиеся компьютерным молекулярным моделированием (в его самом широком смысле), получили в свое распоряжение новый инструмент – так называемые «настольные суперкомпьютеры», мощные вычислительные системы привычного размера, позволяющие производить расчеты самыми разными методами на графических процессорах видеокарт [8,9], в том числе и доступных игровых. Технология эффективного распараллеливания вычислений, которая лежит в основе таких систем, наиболее полно реализована и поддерживается компанией NVIDIA: речь идет о CUDA – «Compute Unified Device Architecture» и ее многочисленных приложениях [10]. В нашем исследовании были использованы адаптированные версии известных пакетов GROMACS (OpenMM Zephyr) [11] и NAMD [12], которые для получения итоговых длинных (1 нс) траекторий молекулярной динамики были запущены на компьютере с процессором Intel Core i7 с 16 Гб ОЗУ и графическим процессором nVidia GeForce 480GTX. Предварительные калибровочные расчеты были выполнены на системе Intel Pentium DualCore Intel Core 2 Duo E6400 с 3Гб ОЗУ и графическим процессором nVidia GeForce 9800GT.

При последующей обработке МД-траектории нами достоверно были детектированы водородные связи как на поверхности, так и внутри белковой глобулы, что потребовало дифференцировки обрабатываемых результатов.

Именно боковые группы кислых и основных аминокислотных остатков, расположенных в периферической части изучаемого фермента и образующих альтернативные водородные связи на поверхности белка, согласно принятой нами концепции [2–4] отвечают за термостабильность фермента в целом; здесь же следует проводить замены аминокислот. Перечень этих остатков был составлен нами в результате изучения пространственной структуры пероксиредоксина 6 человека на графической станции nVidia Quadro FX380 с комплектом 3D Vision.

Способ детектирования образующихся водородных связей на поверхности глобулы в каждом кадре МД-траектории был прокалиброван нами на парах мезофильных и термофильных белков, отличающихся на один аминокислотный остаток: нативном белке теплового шока 1C9O (всего 66 остатков) из бактерии *B. caldolyticus* ($T_{\text{перехода}} = 350$ К) и его мутантном варианте 1I5F (с заменой R3E, $T_{\text{перехода}} = 332,2$ К). Длина траектории AMBER-молекулярной динамики с учетом воды в континуальном приближении составила 1 нс (рис. 2).

В основной части расчетов (непосредственно пероксиредоксин 6) растворитель учитывался как в виде внешнего поля («континуальная модель»), так и в приближении супермолекулы – как «водный ящик» размером $85 \times 85 \times 85$ Å, состоящий из 19264 молекул воды, взятой в модели TIP3P. Заряды системы были компенсированы при помощи ионов хлорида натрия; для молекулы биополимера применялось силовое поле AMBER96; температуру при расчетах

не затрагивают активный центр молекулы этого белка. Предложенные варианты четырех аминокислотных замен далее были проверены нами по уже опробованной схеме детектирования водородных связей на поверхности глобулы – в результате расчета 1 нс-траектории молекулярной динамики. Анализ данных, полученных с неявным и явным учетом растворителя, подтвердил образование и активное переключение водородных связей с участием внесенных в аминокислотную последовательность остатков, что позволяет ожидать наличие повышенной (по сравнению с исходным ферментом) устойчивости предложенных модификаций пероксиредоксина 6 человека к термоденатурации. Рекомбинантный фермент, предложенный в данной работе, уже синтезирован и проходит экспериментальную проверку активности и термостабильности, а описанная методика получила дальнейшее развитие и нашла свое применение в работе с липолитическими ферментами [4,13].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. L. Wise, *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering: Applications* (Marcel Dekker, New York, 1995), vol. 2.
2. N. N. Khechinashvili, M. V. Fedorov, A. V. Kabanov, et al., *J. Biomol. Struct. & Dyn.* **24** (3), 255 (2006).
3. М. С. Кондратьев, А. В. Кабанов, В. М. Комаров и др., *Биофизика* **56** (6), 1045 (2011).
4. N. N. Khechinashvili, A. V. Kabanov, M. S. Kondratyev, and R. V. Polozov, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **32** (9), 1396 (2014).
5. I. V. Peshenko, V. I. Novoselov, V. A. Evdokimov, et al., *FEBS Lett.* **381**, 14 (1996).
6. H. J. Choi, S. W. Kang, C. H. Yang, et al., *Nat. Struct. Biol.* **5** (5), 400 (1998).
7. М. Г. Шаратов, В. И. Новоселов и В. К. Равин, *Молекуляр. биология*, **43** (3), 505 (2009).
8. J. E. Stone, J. Saam, D. J. Hardy, et al., In *Proc. 2nd Workshop on General-Purpose Processing on Graphics Processing Units* (ACM Intern. Conf. Proc. Series, Vol. 383) (New York, USA, 2009), pp. 9–18.
9. J. E. Stone, D. J. Hardy, I. S. Umtsev, and K. Schulten, *J. Mol. Graph. Model.*, **29**, 116 (2010).
10. <http://www.nvidia.ru/object/cuda-parallel-computing-ru.html>.
11. M. S. Friedrichs, P. Eastman, V. Vaidyanathan, et al., *J. Comp. Chem.* **30** (6), 864 (2009).
12. J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, et al., *J. Comp. Chem* **26**, 1781 (2005).
13. Д. А. Черенков, В. А. Анненков, Е. В. Першина и др., в сб.: *Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов*, под ред. В. А. Полякова и Л. В. Римаревой (2012), т. 1, сс. 41–43 (2012).

Computational Ground of Point Mutagenesis to Increase Thermostability of Human Peroxiredoxin 6

M.S. Kondratyev*, A.V. Kabanov*, M.G. Kholyavka**,
M.G. Sharapov*, and N.N. Khechinashvili*

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Voronezh State University, Universitetskaya ploshchad' 1, Voronezh, 394006 Russia*

In this article the algorithm of increasing a thermostability of globular antioxidant enzyme human peroxyredoxin 6 is described. Its recombinant form is based on the analysis of amino acid composition of this enzyme in a rat (*Rattus rattus*). The original concept of increasing the thermostability of small globular proteins used in this work at the expense of alternative hydrogen bonding of the peripheric acidic and basic amino-acid residues is essentially updated by GPU-accelerated molecular dynamics simulations.

Key words: human peroxyredoxin 6, thermostability, molecular dynamics, bioengineering, point mutations, enzymes