

## Конформационная подвижность активного центра мутантной формы 4SER катепсина-L: молекулярная динамика и *ab initio* вычисления

Изотова Е.Д., Багаева Т.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет

[izotova.e.d@gmail.com](mailto:izotova.e.d@gmail.com)

В работе методами молекулярной динамики рассмотрена конформационная подвижность мутантной формы 4SER фермента катепсина-L, обладающего кремний полимеризующей активностью и являющегося перспективным ферментом в области биотехнологии. Активный центр фермента, представлен каталитической триадой: His, Ser, Asp. В ходе молекулярной динамики рассчитаны радиус гирации и геометрические колебания аминокислотных остатков активного центра. Так радиус гирации колеблется в диапазоне 34.6–34.9 Å, средние значения для  $\tau_N$  His – O-Ser составляют 4.99 Å; O-Ser – O-Gln составляют 5.082 Å и  $\tau_N$  His – O-Gln составляют 9.63 Å. Квантово-химическими методами исследована геометрия, порядок и положение водородных связей, распределение парциальных зарядов в восьми конформационных изомерах активного центра мутантного 4SER катепсина-L относительно вращения связи  $C^\alpha-C^\beta$  и степени протонирования имидазольного кольца His. Конформационные изомеры под номерами 2, 3 и 6 являются потенциально вероятными для начального этапа катализа конденсации молекул ортокремниевой кислоты.

*Ключевые слова:* квантово-химические расчеты, молекулярная динамика, активный центр, биосилификация, мутантный 4SER катепсин-L.

## Conformational change in the catalytic center of the 4SER chimera cathepsin-L: molecular dynamics simulations and *ab initio* study

Izotova E.D., Bagaeva T.V.

Kazan (Volga region) Federal University

We report the conformational change of the 4SER chimera cathepsin-L, obtained from molecular dynamics simulations. This enzyme has silicon polymerizing activity and has potential importance for a variety technical and biomedical applications. The catalytic center of the enzyme consists of three amino acid residues, it is His, Ser, Asp. We calculated the radius of gyration and geometric vibrations of the amino acid residues of the catalytic center. So the radius of the gyration varies in the range 34.6–34.9 Å, the average values for  $\tau_N$  His-O-Ser is 4.99 Å; O-Ser-O-Gln is 5.082 Å and  $\tau_N$  – His-O-Gln is 9.63 Å. Quantum-chemical methods are used to study the geometry, order and position of hydrogen bonds, the distribution of partial charges in the eight conformational isomers of the catalytic center relative to the rotation of the  $C^\alpha-C^\beta$  bond and the protonation degree of the imidazole ring His. The conformational isomers under numbers 2, 3, and 6 are potentially probable for the initial stage of catalysis of the condensation of orthosilicic acid molecules.

*Key words:* quantum chemical calculations, molecular dynamics, active enzyme center, biosilicification, cathepsin-L 4SER chimera.

### 1. Введение

Кремнеорганические соединения являются высоко востребованными материалами для производства красок, смол, герметиков, пластмасс, высокоточной оптики и электроники. Высокотехнологичные материалы требуют специфических контролируемых условий, позволяющих получить структуры с заданной

прочностью, жесткостью, пористостью и с другими характеристиками [1]. В тоже время кремниевые губки способны формировать высокоупорядочные кремниевые структуры (спикулы) из аморфного кремнезема, при нормальной температуре, давлении и нейтральном значении pH [2]. Потенциальный интерес для бионанотехнологии представляю два белка, на которые приходится основная роль в

биосилификации аморфного кремнезема, это: силиказы [3] и силикатеины [4], способные к деполимеризации и полимеризации кремнезема, соответственно.

Силикатеины – относятся к классу протеаз и выделяют  $\alpha$ -,  $\beta$  и  $\gamma$  силикатеин. Основную роль в полимеризации отводят силикатеину- $\alpha$ , доля которого составляет 70 % [5]. Выделение нативного фермента для задач биотехнологии является сложным процессом, поскольку фермент синтезируется в виде предшественника, для укладки в активную конформацию требуются специфические белки – шапероны, кроме того фермент неустойчив к кислотам и к колебаниям температуры [6]. Активный центр силикатеина- $\alpha$  представлен тремя аминокислотными остатками: His, Ser, Asp [4]. Основываясь на схожести структур силикатеина- $\alpha$  и катепсина-L (65 % схожести) Jannifer N. Cha с соавторами предложили [7], что реакция протекает в два этапа: на первом этапе образуется ковалентный интермедиат субстрат-Ser-фермент, на втором этапе азот имидазольного кольца His совершает нуклеофильную атаку на атом кремния (субстрата), разрывая силоксановую связь (Si-O), с последующим восстановлением Ser и His, за счет молекулы воды до начального состояния. В подтверждении данной гипотезы имеются лишь косвенные доказательства, кроме того имеются и другие гипотезы протекания биохимической реакции [8]. В частности альтернативным механизмом активации молекул ортокремниевой кислоты с последующей конденсацией может выступать перенос  $H^+$  с молекулы ортокремниевой кислоты на N имидазольного кольца His, с последующей перераспределением электронной плотности и атаки O другой молекулы ортокремниевой кислоты на положительно заряженный атом кремния первой молекулы [8]. Так введение одной точечной мутации в катепсине L Cys25Ser, приводящей к полной идентичности активных центров катепсина L и силикатеина- $\alpha$ , не приводит к появлению у мутантной формы катепсина L кремний конденсирующей активности [8]. Так же полученные поли-имидазол (PVI) и поли-His, обладают кремний конденсирующей способностью [9]. В данной работе обсуждается изменение конформации мутантного белка 4SER ходе молекулярной динамики (МД) и каталитической триады по результатам расчетов методом DFT.

## 2. Моделируемая система и методы расчета

В расчетах использовался активный центр мутантного белка катепсина-L (2VHS, 4SER), кристаллическая структура которого получена из Protein Data Bank [8]. Фермент имеет ряд точечных мутаций и одну замену (173ESTESDNN180 на 173ISNNQ177), в результате которых приобретает кремний полимеризующая активность. Фермент

состоит из четырех гомологичных доменов, в расчетах использовался один домен.

Предварительно, молекулярная система растворена (Gromacs-3.3.1 [10] с потенциалом Amber 99 [11]) в кубе воды, размером  $7.786 \times 6.701 \times 6.386$  нм, произведена молекулярная динамика (МД), согласно протоколу [12]. Геометрия последней точки, использовалась для квантово-химических расчетов извлеченного активного центра. В ходе оптимизаций производилась фиксация атомов азота пептидных групп по трем координатам, для имитации соединения аминокислот с полипептидной цепочкой.

Минимизация и МД проводилась в программе Gromacs с использованием потенциала Amber 99 в течение 1 нс, при температуре 300 К, с учетом модели растворителя PCM [13].

Стационарные состояния каталитической триады рассчитывались методом теории функционала плотности (DFT) в функционале X3LYP[14] в валентно-расщепленном базисе 6-311 + G(d, p)/6-31G(d), с учетом модели растворителя PCM. Расчеты производились в программе PC-GAMESS/Firefly [15]. Для расчета частичных атомных зарядов использовалась зарядовая схема Малликена.

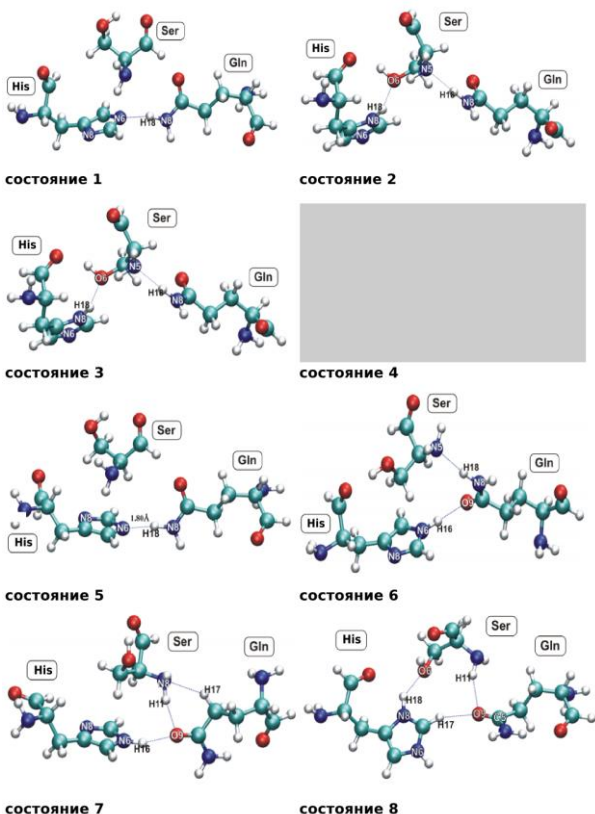
## 3. Результаты

В ходе МД изменение геометрии мутантного фермента 4SER выходит на плато и радиус гирации колеблется в диапазоне 34.6–34.9 Å. Впервые 0.03 нс наблюдается расширение поверхности структуры с последующим колебанием в диапазоне  $42000\text{--}44000 \text{ \AA}^2$ . Так же наблюдается незначительное колебание активного центра (АЦ) в ходе МД. Если оценивать изменение площади треугольника, образованного между аминокислотными остатками АЦ:  $\tau N$  His, O – радикала Ser (O-Ser) и O – радикала Gln (O-Gln), то средняя площадь треугольника составляет  $6.5 \text{ \AA}^2$ , при длинах  $\tau N$  His – O-Ser в 4.99 Å; O-Ser – O-Gln в 5.082 Å и  $\tau N$  His – O-Gln в 9.63 Å.

Конформация фермента в последней точке МД была использована для извлечения координат активного центра и подготовки к серии оптимизаций. За счет степени протонирования азотов имидазольного кольца His и его вращения относительно связи  $C^\alpha\text{--}C^\beta$  сконструировано 8 состояний активного центра (рисунок 1).

Состояние 1 характеризуется одной водородной связью между His и Gln в 1.84 Å, после добавления субстрата и оптимизации, между [Ens-S], образуется 4 водородные связи, энергия связывания комплекса составляет  $-32.82$  ккал/моль. В ходе оптимизации  $H^+$  от молекулы  $H_4SiO_4$  переходит на  $N_3$  имидазольного кольца His, что в дальнейшем может привести к конденсации молекул  $H_4SiO_4$  по основному типу; в состоянии 2 система содержит 2 водородные связи между His-Ser и Ser-Gln в 1.94 Å и 1.97 Å, соответственно; в состоянии 3 так же

имеются 2 водородные связи между His-Ser и Ser-Gln в 2.1 Å и 2.56 Å, соответственно. Состояние 4 не является стационарным, поскольку в ходе оптимизации конформация состояния 4, вращаясь вокруг связи C<sup>α</sup>-C<sup>β</sup> переходит в конформацию, близкую состоянию 8. Состояния 5 и 8 имеют по одной водородной связи между His-Gln в 1.8 Å и His-Ser в 1.83 Å, соответственно. Состояние 6 описывается двумя водородными связями между аминокислотными остатками His-Gln и Gln-Ser в 1.91 Å и 1.96 Å, соответственно и для состояния 7 характерно наличие трех водородных связей между His-Gln и две между Ser и Gln, равные 1.91 Å, 2.1 Å и 2.5 Å соответственно.



**Рис. 1.** Оптимизированные восемь стартовых состояний каталитической триады 4SER мутанта катепсина-L, отличающихся поворотом имидазольного кольца His, относительно связи C<sup>α</sup>-C<sup>β</sup> и степенью протонирования.

При добавлении субстрата и оптимизации комплекса картина несколько изменяется (результаты энергии связывания представлены в таблице 1). Для состояний 5 и 3 наблюдается образование пяти водородных связей между каталитической триадой и субстратом и незначительное удлинение ковалентной связи у субстрата (O-H...Nn) на 0.063 и 0.072 Å, соответственно. Состояние 6 интересно тем, что поворот имидазольного кольца приводит к формированию шести водородных связей между каталитической триадой и субстратом, однако отсутствуют не ковалентные взаимодействия между

непосредственно N<sub>3</sub>/N<sub>1</sub> и субстратом, энергия связывания для этого состояния минимальна среди других состояний и составляет -12.32 ккал/моль. Состояние 8 характеризуется наличием 6 водородных связей между каталитической триадой и субстратом, по 2 на каждый аминокислотный остаток, и энергией связывания в -21.92 ккал/моль.

**Таблица 1.** Энергия связывания и K<sub>p</sub> для всех состояний активного центра

№	Степень протонации	Энергия связывания, ккал/моль	K <sub>p</sub>
1	нет	-32.82	2.681×10 <sup>24</sup>
2	N <sub>3</sub>	-26.69	7.339×10 <sup>19</sup>
3	N <sub>1</sub>	-28.15	8.961×10 <sup>20</sup>
4	N <sub>1</sub> , N <sub>3</sub>	-25.94	2.029×10 <sup>19</sup>
5	нет	-26.78	8.564×10 <sup>19</sup>
6	N <sub>3</sub>	-12.32	2.11×10 <sup>12</sup>
7	N <sub>1</sub>	-16.53	1.479×10 <sup>9</sup>
8	N <sub>1</sub> , N <sub>3</sub>	-21.92	2.067×10 <sup>16</sup>

Для всех вариантов протонирование приводит к увеличению значений длин водородных связей между аминокислотными остатками с 1.8 Å до 2.5 Å, причем протонирование по N<sub>3</sub> приводит к большему увеличению расстояния в независимости от его расположения в мета- или параположении.

При нормальной температуре и физиологическом значении pH равновесие таутомерных форм сдвинуто на частичное протонирование имидазольного кольца, где 80 % приходится на протонирование N<sub>3</sub> и 20 % на -N<sub>1</sub>, а состояния полного протонирования или депротонирования маловероятны [16].

Потенциальными состояниями, в которых возможен начальный этап активации молекулы ортокремниевой кислоты, могут быть: состояние 2, 3 или 6. Наибольшая разница между двумя электроотрицательно заряженными атомами азота имидазольного кольца наблюдается для частично протонированного состояний 2 и 6, в обоих случаях протонирован N<sub>3</sub> имидазольного кольца His.

#### 4. Список литературы

1. Шабанова Н.А., Саркисов П.Д. *Золь-Гель технологии. Нанодисперсный кремнезем.* Москва: Бином, Лаборатория знаний, 2012. 328 с.

2. Schröder H.C., Grebenjuk V.A., Xiaohong W., Muller W.R.G. Hierarchical architecture of sponge spicules: biocatalytic and structure-directing activity of silicatein proteins as model for bioinspired applications. *Bioinspiration & Biomimetics*. 2016. V. 11. P. 041002. doi: [10.1088/1748-3190/11/4/041002](https://doi.org/10.1088/1748-3190/11/4/041002).
3. Schröder H.C., Krasko A., Le Pennec G., Adell T., Wiens M., Hassanein H., Müller I.M., Müller W.E. Silicase, an enzyme which degrades biogenous amorphous silica: contribution to the metabolism of silica deposition in the demosponge *Suberites domuncula*. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*. 2003. V. 33. P. 249–268. doi: [10.1007/978-3-642-55486-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55486-5_10).
4. Müller W.E., Schröder H.C., Burghard Z., Pisignano D., Wang X. Silicateins—a novel paradigm in bioinorganic chemistry: enzymatic synthesis of inorganic polymeric silica. *Chemistry*. 2013. V. 19. P. 5790–804. doi: [10.1002/chem.201204412](https://doi.org/10.1002/chem.201204412)
5. Pozzolini M., Sturla L., Cerrano C., Bavestrello G., Camardella L., Parodi A.M., Raheli F., Benatti U., Müller W.E., Giovine M. Molecular cloning of silicatein gene from marine sponge *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae) and development of primorphs as a model for biosilicification studies. *Mar. Biotechnol. (NY)*. 2004. V. 6. P. 594–603. doi: [10.1007/s10126-004-3036-y](https://doi.org/10.1007/s10126-004-3036-y).
6. Shimizu K., Cha J.N., Stucky G.D., Morse D.A. Silicatein Alpha: Cathepsin L-like protein in Sponge Biosilica. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 6234–6238. doi: [10.1073/pnas.95.11.6234](https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6234).
7. Cha J.N., Shimizu K., Yan Zhou, Christiansen S.C., Chmelka B.F., Galen D.S., Morse D.E. Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 2. P. 361–365. doi: [10.1073/pnas.96.2.361](https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.361).
8. Fairhead M., Johnson K.A., Kowatz T., McMahon S.A., Carter L.G., Oke M., Huanting L., Naismith J.H., Walle C.F., Fairhead M. Crystal structure and silica condensing activities of silicatein a–cathepsin L chimeras. *Chemical Communications*. 2008. P. 1765–1767. doi: [10.1039/B718264C](https://doi.org/10.1039/B718264C).
9. Liang M., Patwardhan S.V., Danilovtseva E.N., Annenkov V.V., Perry C.C. Imidazole catalyzed silica synthesis: Progress toward understanding the role of histidine in (bio)silicification. *J. Mater. Res.* 2009. V. 24. № 5. P. 1700–1708.
10. *Gromacs*. URL: <http://www.gromacs.org/> (дата обращения: 01.06.18).
11. Wang J., Cieplak P., Kollman P.A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *Journal of Computational Chemistry*. 2000. V. 21. № 12. P. 1049–1074. doi: [10.1002/1096-987X\(200009\)21:123.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1096-987X(200009)21:123.0.CO;2-F).
12. Акберова Н.И., Алишева Д.А., Изотова Е.Д., Тарасов Д.С. Сравнение методов расчета электростатических взаимодействий в алгоритмах для графических акселераторов. *Ученые записки КГУ*. 2008. Т. 150. № 2. С. 71–80.
13. Xu X., Goddard III W.A. The X3LYP extended density functional for accurate descriptions of nonbond interactions, spin states, and thermochemical properties. *PNAS*. 2004. V. 101. P. 2673–2677. doi: [10.1073/pnas.0308730100](https://doi.org/10.1073/pnas.0308730100).
14. Miertuš S., Scrocco E., Tomasi J. Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of AB initio molecular potentials for the prevision of solvent effects. *Chemical Physics*. 1981. V. 55. P. 117–129. doi: [10.1016/0301-0104\(81\)85090-2](https://doi.org/10.1016/0301-0104(81)85090-2).
15. Gordon M.S., Schmidt M.W. Advances in electronic structure theory: GAMESS a decade later. Theory and Applications of Computational Chemistry: the first forty years. *Elsevier. Amsterdam*. 2005. P. 1167–1189. doi: [10.1016/B978-044451719-7/50084-6](https://doi.org/10.1016/B978-044451719-7/50084-6).
16. Hansena A.L., Kaya L.E. Measurement of histidine pKa values and tautomer populations in invisible protein states. *Plus Biophysics and Computational Biology*. 2014. P. 1705–1712. doi: [10.1073/pnas.1400577111](https://doi.org/10.1073/pnas.1400577111).