

КОМПЬЮТЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

УДК577.152.3.

©Коллектив авторов

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ ПОЛНОРАЗМЕРНОГО ЦИТОХРОМА b_5 .

А.С.ИВАНОВ, В.С.СКВОРЦОВ, А.И.АРЧАКОВ

Эл. почта: ivanov@ibmh.msk.su

НИИ Биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН
119832, Москва, Погодинская ул., д.10, Факс: (095) 245-0857

Произведена компьютерная реконструкция трехмерной структуры полноразмерного цитохрома b_5 . Работа выполнена с использованием программного комплекса Sybyl 6.4 фирмы Tripos, работающего на графической станции Silicon Graphics Indigo2 (R4400, XZ). Реконструкция осуществлена путем компьютерного моделирования мембранной части цитохрома b_5 с последующим соединением ее со структурой известной водорастворимой части b_5 (фрагмент с 5 по 91 аминокислотный остаток - файл 3B5C в белковом банке данных PDB). Полученная структура полноразмерного цитохрома b_5 была оптимизирована в бинарной системе полярного и неполярного растворителей методами молекулярной динамики и детерминированной минимизации. Молекулярная динамика была выполнена в боксе с периодически граничными условиями с шагом в 1 фс в течение 550 пс при постоянном числе частиц, давлении и температуре. Бокс содержал бинарную систему растворителей. Равновесие системы было достигнуто после 400 пс. С периодом в 5 пс выполнялась процедура минимизации энергии без остановки молекулярной динамики. В результате было получено 100 конформаций полноразмерного цитохрома b_5 . Величина потенциальной энергии колебалась в пределах от $-2.7 \cdot 10^4$ до $-4.2 \cdot 10^4$ ккал/моль. В качестве конечной конформации была выбрана та, у которой была минимальная величина потенциальной энергии. Анализ липофильной поверхности полученной модели показал, что мембранная часть белка является более гидрофобной и формирует петлевую структуру. Модель соответствует ряду известных экспериментальных данных о структуре цитохрома b_5 .

Ключевые слова: цитохром b_5 , молекулярное моделирование, молекулярная динамика, мембранный якорь, структура белка, компьютерное моделирование

ВВЕДЕНИЕ. Цитохром b_5 (b_5) является мембранным белком, широко распространенным в живой природе и присутствует в различных клеточных мембранах [1]. Он участвует во многих биохимических окислительно-восстановительных реакциях в качестве переносчика электронов. Известно, что цитохром b_5 играет важную роль в процессах латерального и межмембранного переноса электронов, так же как и в восстановлении цитохрома P450 [2]. Цитохром b_5 состоит из двух доменов: каталитическая водорастворимая часть (аминокислотные остатки 1-88) и мембранная часть (остатки 89-133). Молекула b_5 может быть разделена на эти фрагменты с помощью трипсина [3]. Трипсиновый фрагмент ($t-b_5$) представляет собой гидрофильную гем-содержащую часть белка, сохраняющую его физико-химические и окислительно-восстановительные свойства. Связанный с мембраной С-концевой гидрофобный фрагмент b_5 ($mb-b_5$) играет роль мембранного якоря. Он может быть успешно использован как универсальный, латерально подвижный мембранный якорь, для ассоциации с мембраной различных рекомбинантных белков [4]. В настоящее время трехмерная структура полноразмерного (full length) цитохрома b_5 ($fl-b_5$) неизвестна. Детальный анализ трехмерной структуры $t-b_5$ (остатки 5-91) из печени быка был выполнен с помощью рентгеноструктурного анализа [5] и ядерного магнитного резонанса [6, 7]. Трехмерные координаты этой структуры доступны в белковом банке PDB [8] (файлы 3B5C [9] и 1CYO [10]). Цитохром b_5 , являясь мембранным белком, прикреплен к биологической мембране С-концевым участком, содержащим гидрофобные аминокислотные остатки. Ряд противоречивых экспериментальных данных указывает на различные формы мембранного якоря b_5 . Предложены две различные модели якоря: петлевая и трансмембранная. Ozols [11] исследовал топологию b_5 используя обработку различными протеазами с последующим анализом образующихся фрагментов. Было показано, что после действия протеаз фрагмент 103-127 остается в мембране, а все остальные пептиды обнаруживаются по одну сторону мембраны. Эти данные указывают на петлевую структуру мембранного якоря. Аналогичные результаты были получены ранее в экспериментах с карбоксипептидазой Y, расщеплявшей b_5 , встроенный в однослойные липосомы [12]. Было показано, что С-конец b_5 , также как и гем-содержащий гидрофильный домен ($t-b_5$) экспонированы на наружной поверхности везикулярной мембраны. Противоположные результаты были получены в более позднем исследовании [13] где авторы показали, что С-конец белка в микросомах защищен от действия добавленной карбоксипептидазы Y, до тех пор пока мембрана не разрушена детергентом. Это может указывать на трансмембранную топологию b_5 , когда мембранный домен пронизывает бислой.

Целью данной работы являлась реконструкция трехмерной структуры $fl-b_5$ и сравнение полученной модели с известными экспериментальными данными и гипотезами о мембранной топологии b_5 . Модель $fl-b_5$ может быть использована в последующих компьютерных исследованиях комплексов b_5 с другими белками-партнерами, такими как цитохром P450 и цитохром P450 редуктаза.

Предварительная модель $fl-b_5$ была создана на основе известной трехмерной структуры $t-b_5$ (файл 3B5C из белкового банка PDB) путем компьютерного моделирования мембранного якоря ($mb-b_5$) и его присоединения к $t-b_5$. Эта структура была оптимизирована в бинарной системе полярного и неполярного растворителей с помощью молекулярной динамики и минимизации

энергии. Полученная модель соответствует гипотезе о мембранной топологии b_5 с петлевой структурой мембранного якоря.

МЕТОДИКА. Структура водорастворимого домена b_5 ($t-b_5$) быка (файл 3B5C из белкового банка PDB) была использована как основа для компьютерного моделирования целой структуры b_5 ($fl-b_5$). Трехмерная модель $fl-b_5$ была создана как комбинация $t-b_5$ и компьютерной модели $mb-b_5$. В работе был использован программный комплекс Sybyl 6.4 фирмы Tripos [14] и рабочая графическая станция Indigo-2 (R4400, XZ) фирмы Silicon Graphics. Минимизация энергии и молекулярная динамика выполнялись с помощью методов, входящих в программный комплекс Sybyl - метод Powell (аналогичен методу конъюгированного градиента, но более быстрый) [15] и метод Verlet [16] соответственно. В обоих случаях использованы периодически граничные условия. Оптимизация трехмерной модели мембранной части белка должна выполняться с учетом ее взаимодействия с липидным бислоем биологической мембраны. Моделирование системы белок-бислой требует огромные объемы вычислений. В случае ограниченности вычислительных ресурсов может быть использован ряд подходов, таких как имитация границы вода-мембрана с помощью двух сред с различной диэлектрической константой [17]. Минимизация энергии модели гидрофобной части белка в первом приближении может быть выполнена в неполярном растворителе. Известно, что взаимодействие мембранной белковой части с липидами бислоя в основном обусловлено неспецифическим гидрофобным взаимодействием. В комплексе Sybyl имеется несколько предварительно рассчитанных боксов с различными растворителями. Однако предварительные эксперименты с имеющимися боксами растворителей показали, что ни один не может быть использован для наших целей. Попытка формирования бинарной системы «вода-хлороформ» была неудачной из-за миграции некоторых молекул хлороформа в водную фазу с последующим разрушением элементов вторичной структуры в водорастворимой части белка ($t-b_5$). Этот результат соответствует известным данным о довольно высокой растворимости хлороформа в воде и его денатурирующем действии на белки [18]. Таким образом, нам пришлось создать новый бокс с неполярным растворителем. В качестве последнего мы выбрали бензол, который нерастворим в воде и его молекулы относительно малы и жестки. Последний факт значительно облегчает вычисления по оптимизации белка в сложной бинарной системе растворителей. Для получения уравновешенного бокса с бензолом была выполнена предварительная молекулярная динамика в периодически граничных условиях. Для моделирования водной фазы был использован имеющийся в составе комплекса Sybyl предварительно вычисленный бокс с водой [19].

При компьютерном моделировании $fl-b_5$ были выполнены следующие этапы:

1. Моделирование по гомологии трехмерной структуры $mb-b_5$ (остатки 89-133) с использованием модуля "Composer" [20], входящего в состав комплекса Sybyl, и структур белков из PDB;
2. Минимизация энергии полученной структуры в неполярном растворителе;
3. Соединение модели мембранного якоря с $t-b_5$ путем совмещения остатков 89-91 обоих фрагментов;
4. Добавление к полученной структуре четырех N-концевых остатков (остатки 1-4), отсутствующих в файле PDB;

5. Оптимизация структуры fl- b_5 в бинарной системе полярного и неполярного растворителей с помощью молекулярной динамики и минимизации энергии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В белковом банке PDB были найдены два белка (цитратсинтаза [21] и аспартат аминотрансфераза [22]), содержащие фрагменты с гомологией более 80% к mb- b_5 (остатки 89-133). Выравнивание последовательностей было выполнено с учетом аминокислотных замен с использованием матрицы p -мутаций [23]. Найденные белки содержат три структурно консервативных области (SCR) (рис. 1). Был осуществлен поиск в PDB промежуточных между SCR участков основываясь в начале на позиции в пространстве якорных $C\alpha$ атомов, а затем по гомологии [24]. Наилучшие структуры были получены из четырех белков: иммуноглобулин человека [25], d-ксилоизомераза из *Arthrobacter* [26], карбоксипептидаза А человека [27] и p -гидроксibenзоатгидроксилаза из *Pseudomonas Fluorescens* [28]. Полученная предварительная структура имела форму петли. Эта модель мембранного фрагмента b_5 была минимизирована в неполярном растворителе (бензол). Результирующая петлевая структура показана на рис. 2.

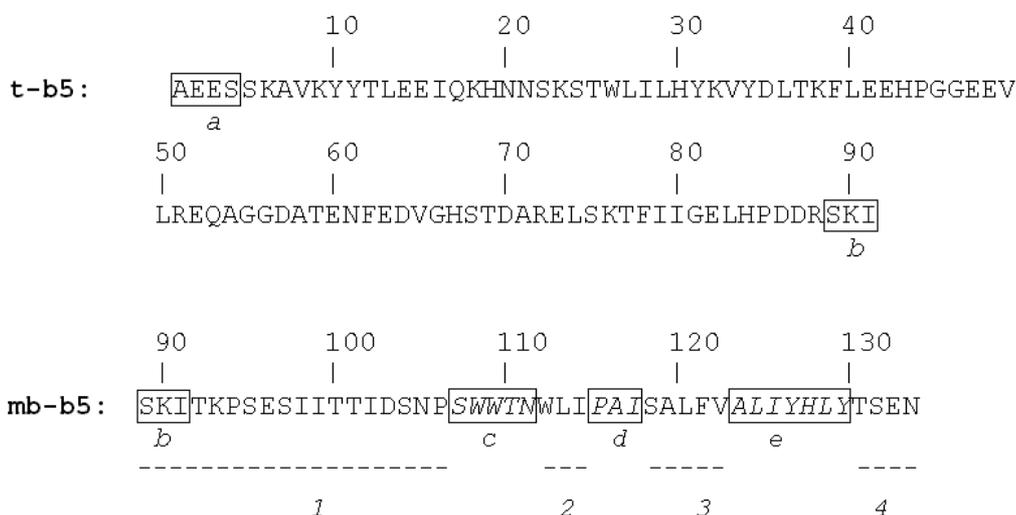


Рисунок 1.

Последовательности t- b_5 и mb- b_5 . *a* - четыре N-концевых остатка (остатки 1-4), отсутствующие в кристаллической структуре t- b_5 ; *b* - остатки 89-91, использовавшиеся для соединения модели mb- b_5 и t- b_5 ; *c*, *d*, *e* - структурно консервативные области (SCR1 - SCR3), найденные по гомологии фрагментов (более 80%) в цитратсинтазе (2CTS) и аспаратаминотрансферазе (2AAT). Петли между участками SCR были найдены в белках из PDB первоначально на основе позиций якорных $C\alpha$ атомов и затем по гомологии: 1 - петля из 3MSG; 2 - петля из 4XIA; 3 - петля из 5CPA; 4 - петля из 2PHH.

Структура мембранного фрагмента, полученная на первом этапе моделирования, была совмещена с водорастворимой частью цитохрома b_5 (t- b_5) по остаткам 89-91.

Четыре N-концевых остатка, координаты которых отсутствуют в PDB файле (3B5C), были добавлены к модели в случайной конформации.

Связанный с мембраной участок fl- b_5 (остатки 104-126) были погружены в каплю неполярного растворителя. Для этой цели мы использовали бокс с молекулами бензола, предварительно сбалансированными с помощью

молекулярной динамики. Полученный в результате комплекс был помещен в водную фазу, которая тоже была предварительно уравновешена молекулярной динамикой. Полученный бокс с начальной конформацией fl- b_5 и бинарной системой растворителей был использован для конечной оптимизации модели. Молекулярная динамика выполнялась с шагом 1 фс при постоянном числе частиц, давлении (1 атмосфера) и температуре (300 К) в течении 550 пс с использованием силового поля Kollman [29]. Равновесие системы было достигнуто после 400 пс (рис. 3). Сравнение величин RMS для fl- b_5 (1), mb- b_5 (2) and t- b_5 (3) показывает, что значительные изменения имели место в основном в структуре mb- b_5 . Конформация t- b_5 изменилась минимально (RMS=2 Å) и стабилизировалась после 50 пс. Изменение конформации fl- b_5 следовало за изменением конформации mb- b_5 и стабилизировалось через 400 пс. Процедура минимизации энергии для текущей конформации белка выполнялась через каждые 5 пс без прерывания молекулярной динамики. Таким образом, было получено 100 конформаций fl- b_5 . Потенциальная энергия системы белок/растворитель была в пределах от $-2.7 \cdot 10^4$ до $-4.2 \cdot 10^4$ ккал/моль. Конформация fl- b_5 с минимальной величиной потенциальной энергии была выбрана как конечный результат моделирования.

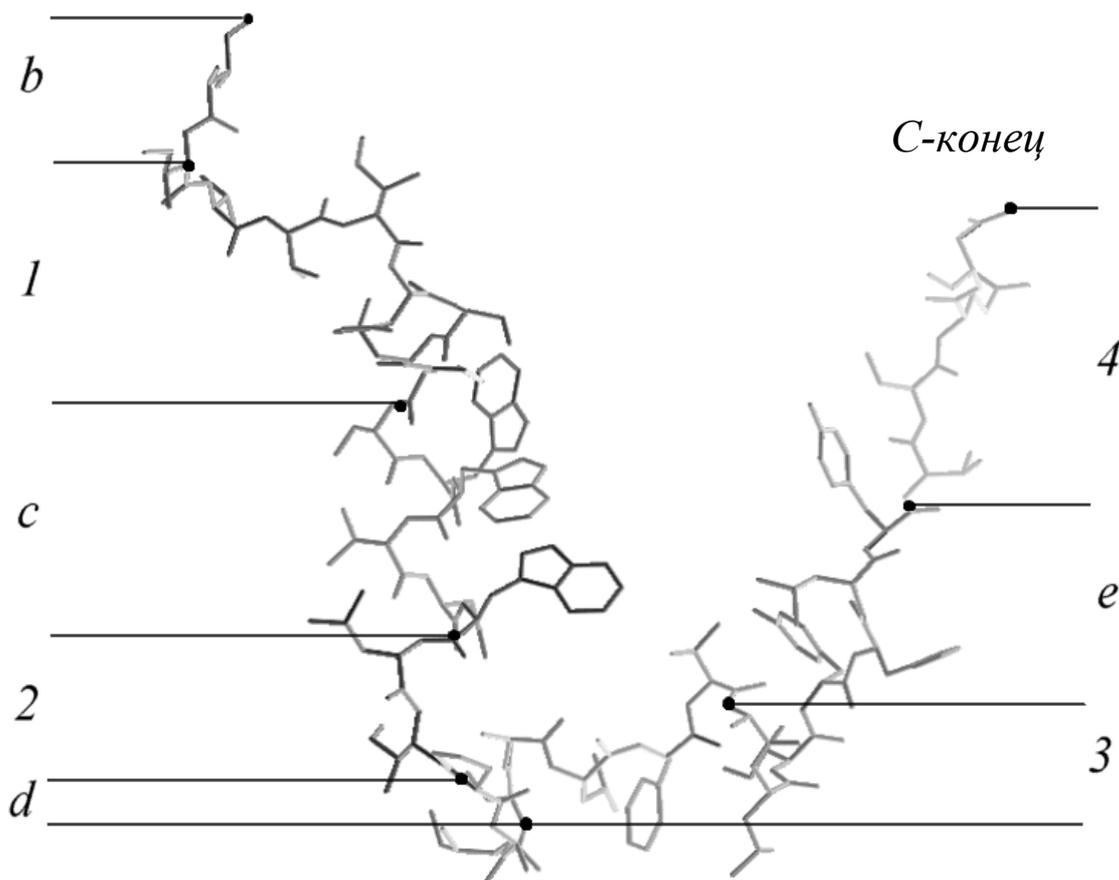


Рисунок 2.
Петлевая форма предварительной структуры mb- b_5 .
Все пометки – как на рис. 1.

На рис. 4А показаны t- b_5 (1) и fl- b_5 (2) в схематическом представлении. Мембранный домен (mb- b_5) образует компактную петлю, хорошо контактирующую с t- b_5 (рис. 4Б). Эти результаты показывают, что в ходе

молекулярной динамики произошла стерическая адаптация $mb-b_5$ к структуре $t-b_5$ и следовательно имел место феномен внутримолекулярного узнавания между двумя доменами белка. Этот вывод подтверждается также тем фактом, что С-концевая аминокислота, входящая в структуру $mb-b_5$, в ходе молекулярной динамики «нашла» углубление на поверхности фрагмента $t-b_5$ рядом с N-концом белка (рис. 4В). В результате произошла взаимная нейтрализация зарядов и стабилизация структуры за счет электростатического взаимодействия. Реальность построенной модели может быть дополнительно проверена по участкам белковой цепи, доступным для действия протеаз. Разумно предположить, что все эти участки должны быть расположены на поверхности белковой глобулы. Ранее было показано, что фрагмент 103-127 остается в мембране после действия протеаз [11]. Анализ трехмерной структуры построенной модели выявил, что оба остатка 103 и 127 расположены на поверхности и могут быть доступны для действия протеаз. Участок расщепления молекулы b_5 на мембранный и водорастворимый фрагменты при действии трипсина (остатки 88-89) также расположен на поверхности белка (рис. 4В) Раскраска поверхности молекулы $fl-b_5$ по величине липофильного потенциала [30] показана на рис. 4Г. Очевидно, что молекула имеет преимущественно гидрофильную поверхность, однако связанная с мембраной петлевая структура имеет более гидрофобную поверхность. Максимальная гидрофобность наблюдается в средней части петли, которая соответствует самой глубокой мембранной части.

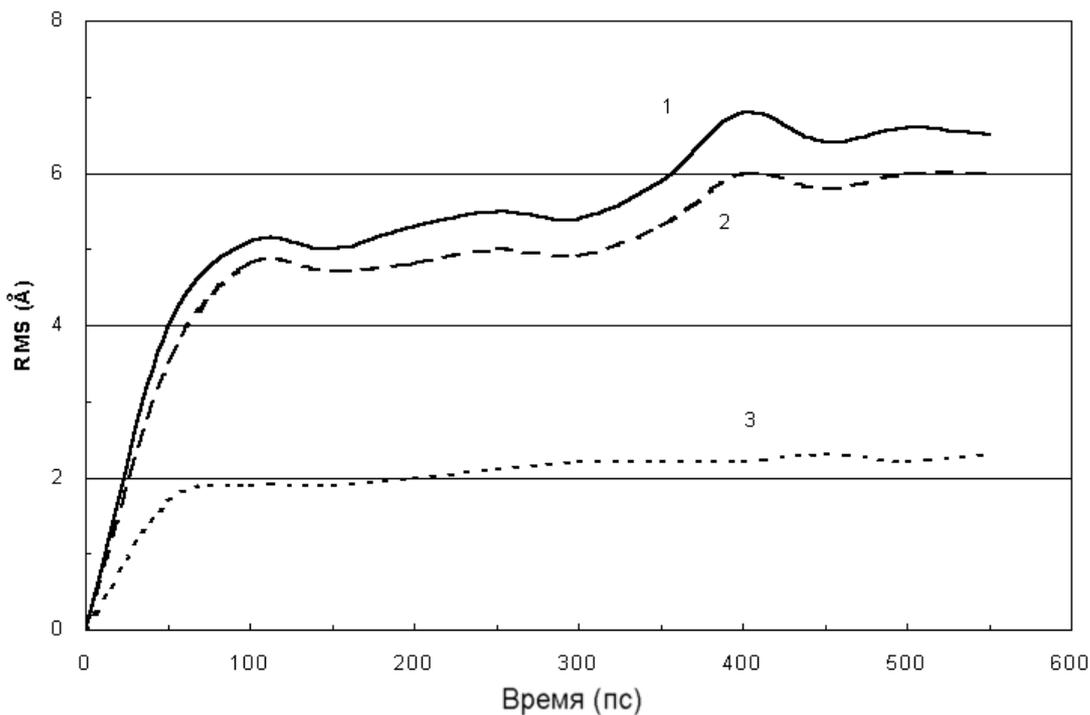
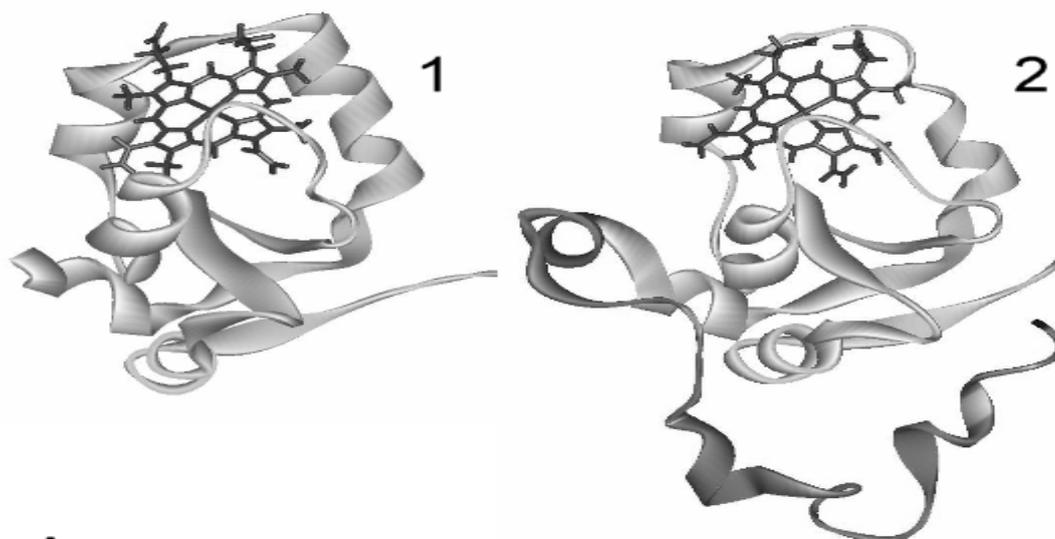


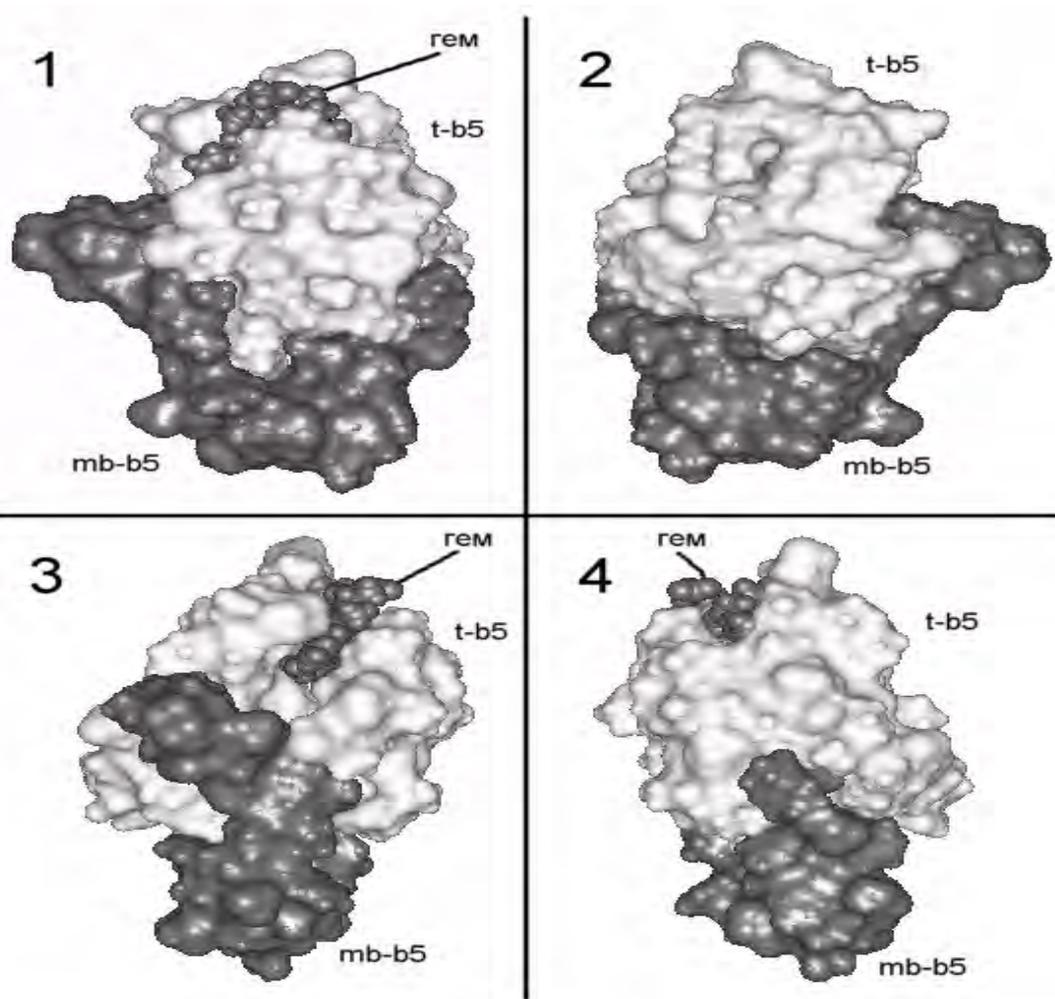
Рисунок 3.
Изменения величин RMS для $fl-b_5$ (1), $mb-b_5$ (2) и $t-b_5$ (3) в течение 600 пс молекулярной динамики.

Таким образом, полученная молекулярная модель соответствует гипотезе о топологии b_5 с петлевой структурой мембранной части. Эта модель может быть использована в дальнейшем компьютерном моделировании молекулярного

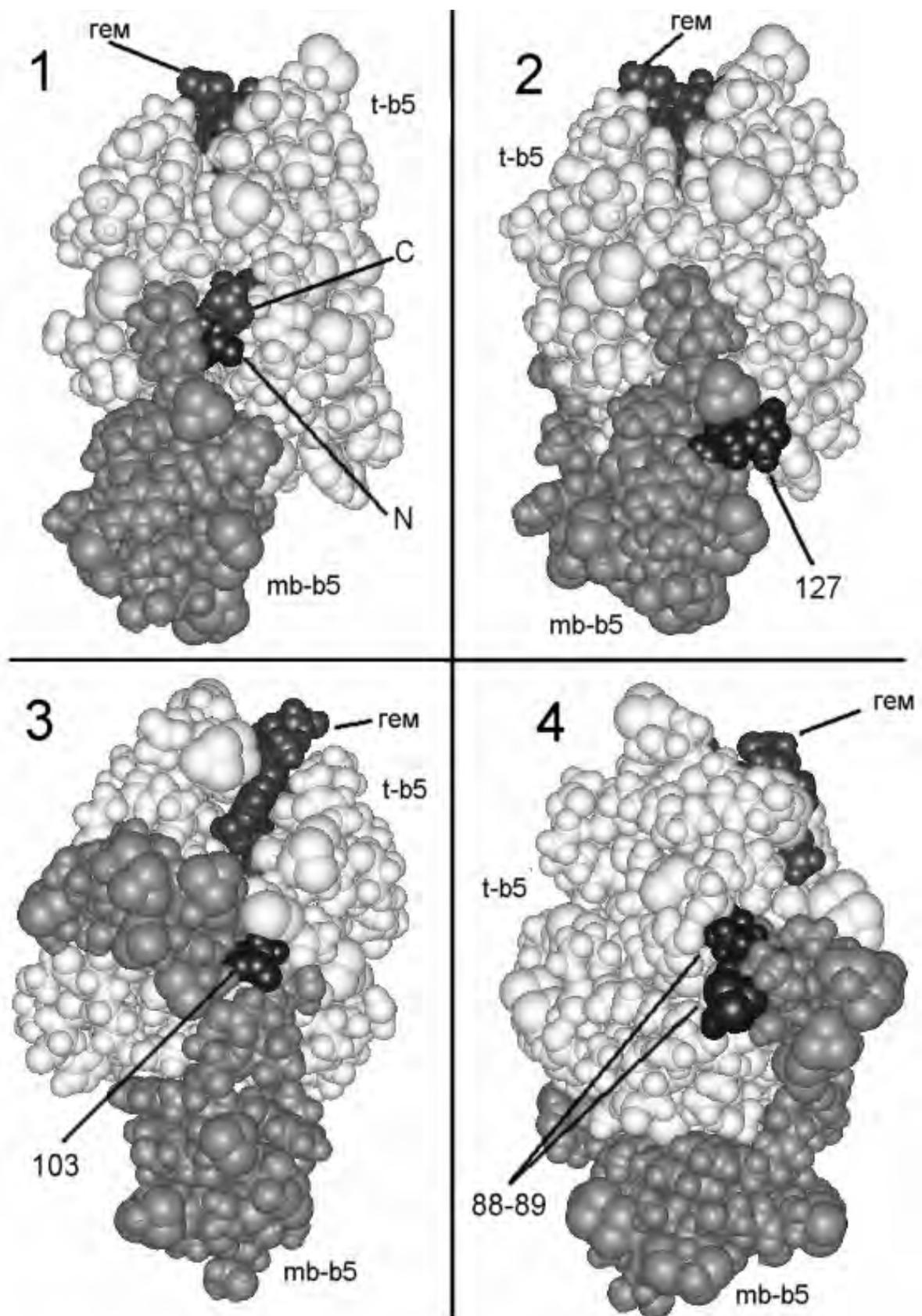
узнавания в комплексах b5 с его белками-партнерами системы митохондриального окисления.



A



Б



B

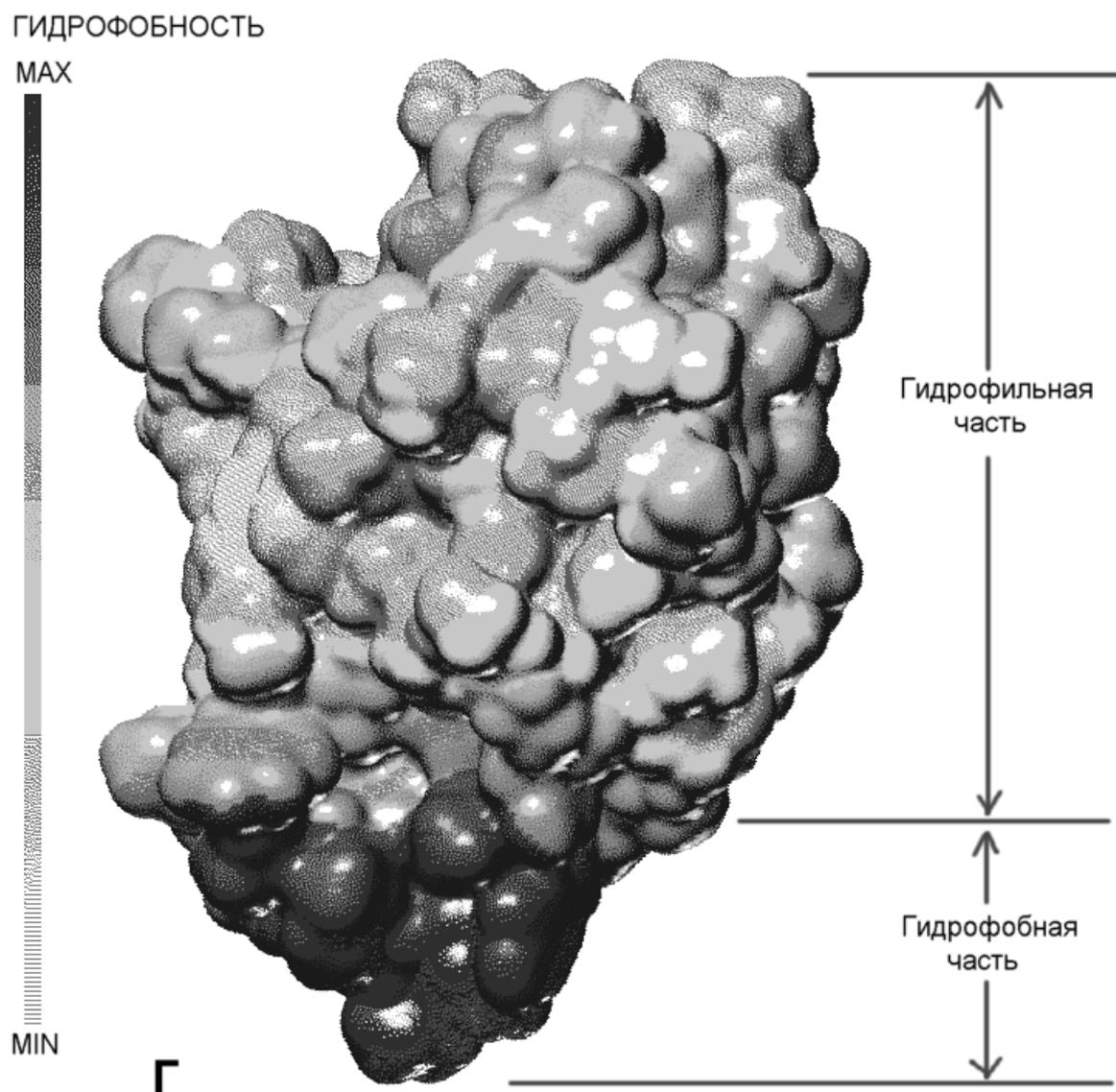


Рисунок 4.

Оптимизированная модель fl- b_5 .

А. Схематическое представление $t-b_5$ (1) и fl- b_5 (2).

Б. Взаиморасположение фрагментов $t-b_5$ (светлый) и mb- b_5 (темный) в структуре fl- b_5 .

1 - вид спереди, 2 - вид сзади, 3- вид слева, 4 – вид справа.

В. Расположение N- и С-концевых аминокислотных остатков (1), остатков 127 и 103 (2, 3) и остатков 88-89.

Г. Гидрофобность поверхности fl- b_5 .

Данная работа была частично поддержана РФФИ (гранты 96-07-89360 и 99-04-48754). Авторы благодарят фирмы Tripos GmbH (Мюнхен, Германия) и NC Group (Москва, Россия) за научную и техническую поддержку.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Spatz L., Strittmatter P.* (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **68**, 1042-1046.
2. *Archakov A.I., Karyakin A.V., Skulachev V.P.* (1974) FEBS Letters, **39**, 239-242.
3. *Tajima S., Enomoto K., Sato R.* (1978) J. Biochem. (Tokyo), **84**, 1573-1586.
4. *George S.K., Xu Y.H., Benson L.A., Pratsch L., Peters R., Ihler G.M.* (1991) BBA, **1066**, 131-143.
5. *Mathews F.S., Levine M., Argos P.* (1972) J. Mol. Biol., **64**, 449-464.
6. *Moore C.D., Al-Misky O.N., Lecomte J.T.J.* (1991) Biochemistry, **30**, 8357-8365.
7. *Moore C.D., Lecomte J.T.J.* (1993) Biochemistry, **32**, 199-207.
8. *Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E.* (2000) Nucleic Acids Research, **28**, 235-242.
WWW address: <http://www.rcsb.org/pdb/>
9. PDB ID: **3B5C**
Mathews F.S., Levine M., Argos P. (1972) J. Mol. Biol., **64**, 449-464.
10. PDB ID: **1CYO**
Mathews F.S., Argos P., Levine M. (1972) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **36**, 387-395.
11. *Ozols J.* (1989) BBA, **997**, 121-130.
12. *Tajima S., Sato R.* (1980) J. Biochem. (Tokyo), **87**, 123-134.
13. *Vergeres G., Waskell L.* (1995) Biochimie, **77**, 604-620.
14. SYBYL 6.4, Tripos Inc., 1699 South Hanley Road, St. Louis, Missouri, 63144, USA.
15. *Powell M.J.D.* (1977) Mathematical Programming, **12**, 241-254.
16. *Verlet L.* (1967) Phys. Rev., **159**, 98-103.
17. *Areas E.P., Pascutti P.G., Schreier S., Muddin K.C., Bisch P.M.* (1994). Braz. J. Med. Biol. Res., **27**, 527-533.
18. Denaturation. In: The Columbia Encyclopedia, Sixth Edition, 2000, Columbia University Press.
WWW address: <http://www.infoplease.com/encyclodict.html>
19. *Jorgensen W.L., Tirado-Rives J.* (1988) J. Am. Chem. Soc., **110**, 1666-1671.
20. *Blundell T., Carney D., Gardner S., Hayes F., Howlin B., Hubbard T., Overington J., Singh D.A., Sibanda B.L., Sutcliffe M.* (1988) Eur. J. Biochem., **172**, 513-520.
21. PDB ID: **2CTS**
Remington S., Wiegand G., Huber R. (1982) J. Mol. Biol., **158**, 111-152.
22. PDB ID: **2AAT**
Smith D.L., Almo S.C., Toney M.D., Ringe D. (1989) Biochemistry, **28**, 8161-8167.
23. *Needleman S.B., Wunsch C.D.* (1970) J. Mol. Biol., **48**, 443-453.
24. *Fine R.M., Wang H., Shenkin P.S., Yarmush D.L., Levinthal C.* (1986) Proteins, **1**, 342-362.
25. PDB ID: **3MCG**
Ely K.R., Herron J.N., Harker M., Edmundson A.B. (1989) J. Mol. Biol., **210**, 601-615.

26. PDB ID: **4XIA**
Henrick K., Collyer C.A., Blow D.M. (1989) *J. Mol. Biol.*, **208**, 129-157.
27. PDB ID: **5CPA**
Rees D.C., Lewis M., Lipscomb W.N. (1983) *J. Mol. Biol.*, **168**, 367-387.
28. PDB ID: **1PHH**
Schreuder H.A., van der Laan J.M., Hol W.G., Drenth J. (1988) *J. Mol. Biol.*, **199**, 637-648.
29. *Weiner S.J., Kollman P.A., Case D.A., Singh U.C., Ghio C., Alagona G., Profeta S., Weiner P.* (1984) *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 765-784.
30. *Croizet F., Langlois M.H., Dubost J.P., Braquet P., Audry E., Dallet P., Colleter J.C.* (1990) *J. Mol. Graph.* **8**, 153-155.

Поступила 28.09.00

COMPUTER MODELLING OF 3D STRUCTURE OF THE FULL-LENGTH CYTOCHROME B5

A.S.IVANOV, V.S.SKVORTSOV, A.I.ARCHAKOV

Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya str. 10, Moscow, 119832, Russia
Fax: 007 (095) 245-0857, ivanov@ibmh.msk.su

The computer-aided reconstruction of 3D structure of full-length cytochrome b₅ was done. Software Sybyl 6.4 from Tripos running on workstation Silicon Graphics Indigo2 (R4400, XZ) was used. The reconstruction was carried out by computer modelling of membrane part of cytochrome b₅ with subsequent linking with known structure of water-soluble b₅ part (fragment 5-91 of amino acid residuals - file 3B5C in a protein data bank PDB). The obtained structure of full-length cytochrome b₅ was refined in the mixture of polar and nonpolar solvents by molecular dynamics simulation and deterministic minimization. Molecular dynamics simulation was performed in periodic box of binary system of solvents with a step of 1 fs during 550 ps at constant number of particles, pressure and temperature. The balance of system was achieved after 400 ps. With period in 5 ps the potential energy was minimized without molecular dynamics interruption. As a result 100 conformations of full-length cytochrome b₅ were obtained. Distribution of potential energy was from $-2.7 \cdot 10^4$ to $-4.2 \cdot 10^4$ kcal/mol. Conformation of cytochrome b₅ with minimal value of potential energy was accepted as the final. Analysis of lipophilic surface of obtained model have shown that membrane bounded part is more hydrophobic and forms a loop structure. This model corresponds to some known experimental data about cytochrome b₅ structure.

Keywords: cytochrome b₅, molecular modelling, molecular dynamics simulation, membrane anchor, protein structure, computer simulation