

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

УДК577.152.3.

©Коллектив авторов

КОМПЬЮТЕРНАЯ МОДЕЛЬ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ ЦИТОХРОМА P450 2B4

*А.А. Сеченых,¹ А.В. Дубанов¹, В.С. Скворцов¹, А.С. Иванов¹, А.И. Арчаков¹,
П. Вильямс,² Дж. Косме,² Е.Ф. Джонсон,³ Д.Е. Макри⁴*

¹ ГУНИИ Биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН,
119121, Москва, Погодинская ул., д.10, факс: (095) 245-0857;

² Astex Technology Ltd, 250 Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge,
CB4 0WE, UK;

³ The Scripps Research Institute, 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla CA 92037, USA;

⁴ Syrrx, Inc., 10450 Science Center Drive, Suite 100, San Diego, CA 92121, USA.

Цитохромы P450 играют важную роль в окислительном метаболизме ксенобиотиков. Для изучения структурно-функциональных зависимостей и взаимодействий с белками-партнерами необходима информация об их трехмерной структуре. Экспериментальное определение трехмерных структур эукариотических цитохромов P450 методом рентгеноструктурного анализа затруднено из-за наличия гидрофобного мембранного якоря и гидрофобных участков на поверхности белковой глобулы, препятствующих кристаллизации. Одним из методов решения этой проблемы может быть замена гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности белка на гидрофильные, которые не приводят к изменению пространственной структуры и функции белка. Такие замены могут быть предложены на основе компьютерной модели трехмерной структуры белка. Данная работа посвящена компьютерному моделированию трехмерной структуры цитохрома P450 2B4 (CYP2B4). Построенная нами модель в дальнейшем может быть использована для предсказания мутаций, направленных на гидрофилизацию поверхности белка. Моделирование трехмерной структуры CYP2B4 было выполнено по гомологии с цитохромом P450 2C5. Модель была оптимизирована методами минимизации энергии и молекулярной динамики молекулы белка в водном окружении. Сопоставление полученной модели с экспериментальными данными о местах взаимодействия с субстратом и белками-партнерами и известных поверхностных аминокислотных остатках, а также проверка модели с помощью специальных программ, базирующихся на статистике стереохимических параметров пространственных структур белков, указывают на ее достоверность.

Ключевые слова: цитохром P450, молекулярное моделирование, молекулярная динамика, структура белка, компьютерное моделирование.

ВВЕДЕНИЕ. Изучение структуры и функции цитохромов P450 представляет большой практический интерес, так как они играют ведущую роль в окислительном метаболизме многих экзогенных и эндогенных

низкомолекулярных веществ. P450 обнаруживаются в большинстве живых организмов и образуют обширное белковое суперсемейство. Ферментативный цикл P450 состоит из таких этапов как связывание субстрата, перенос электрона, присоединение кислорода, активирование и окисление субстрата. Существует много различий в молекулярных механизмах функционирования представителей P450, которые, кроме того, могут демонстрировать перекрестную субстратную специфичность. Основная трудность, с которой сталкиваются исследователи - отсутствие данных о пространственной структуре большинства P450. Экспериментальное изучение трехмерной структуры микросомальных P450 с помощью рентгеноструктурного анализа затруднено, так как эти мембранные белки практически не кристаллизуются. Последнее обусловлено наличием гидрофобного мембранного якоря, а также гидрофобных участков на поверхности белковой глобулы, что приводит к агрегации белка в водном растворе. Поэтому было предложено уменьшить гидрофобность белков и, соответственно, повысить вероятность кристаллизации через модификации гидрофобных участков: удаление мембранного якоря (N-концевого фрагмента) и точечных мутаций на поверхности молекулы P450[1]. Ряд исследователей пытается решить проблему с помощью методов генной инженерии - модифицировать молекулы P450 путем удаления мембранного якоря (N-концевого фрагмента) и точечных мутаций на поверхности белка для уменьшения его гидрофобности, что позволит ему находиться в водном растворе в мономерном состоянии и кристаллизоваться [1-3].

Основной проблемой в реализации этого метода является поиск гидрофобных кластеров на поверхности P450 и выбор оптимального варианта точечных мутаций для уменьшения общей гидрофобности поверхности без изменения пространственной структуры белка. В связи с этим представляется целесообразным построение трехмерных компьютерных моделей P450 с особо тщательным моделированием поверхностей молекул. На основе анализа структуры гидрофобных кластеров и участков взаимодействия с белками-партнерами можно спрогнозировать минимальное число точечных мутаций для последующего получения методами генной инженерии модифицированных водорастворимых кристаллизующихся микросомальных P450.

Как показали результаты международных экспериментов CASP3 и CASP4 (Critical Assessment of protein Structure Prediction), точность моделирования пространственной структуры белка зависит от уровня сходства целевого белка и белков-гомологов [4]. Даже при идентичности аминокислотных последовательностей 30% среднеквадратичное отклонение (RMS) определения позиций α атомов достигает 1,5 Å [5]. Моделирование при идентичности < 20% сталкивается с большими сложностями, а достоверность полученной модели вызывает большие сомнения [6].

В данной работе в качестве объекта моделирования нами был выбран цитохром P450 2B4 (CYP2B4). Ранее неоднократно предпринимались попытки компьютерного моделирования трехмерной структуры глобулярной части (без мембранного якоря) цитохромов P450 подсемейства 2B. Первой такой попыткой было моделирование цитохрома CYP2B1 [7] на основе гомологии со структурой бактериального цитохрома CYP101 [8] из белкового банка данных PDB [9]. После установления пространственной структуры еще трех бактериальных P450 (CYP102 [10], CYP107 [11] и CYP108 [12]) были построены две модели структуры CYP2B4 [13-15]. В качестве структуры-образца был использован бактериальный цитохром CYP102 (PDB индекс - 2hpd) [10], т.к. среди бактериальных P450 с известной пространственной структурой он имеет наибольшее сходство с P450 млекопитающих.

Участки аминокислотных последовательностей P450 эукариот, которые консервативны у всех членов суперсемейства и отвечают за связывание гема и частично за формирование места связывания лиганда, не вызывают затруднений при моделировании по гомологии. Однако, низкий уровень сходства при

выравнивании аминокислотных последовательностей (идентичность - около 20%) не позволяет достоверно моделировать вариабельные участки, к которым относятся и участки молекулярной поверхности [6].

В 2000 году методом рентгеноструктурного анализа впервые была установлена пространственная структура эукариотического цитохрома CYP2C5 (код PDB - 1dt6) [3]. Кристаллизация этого белка стала возможной после получения его водорастворимой формы в результате удаления гидрофобного мембранного якоря, включающего с 3 по 21 аминокислотные остатки (а.о.), и замены ряда гидрофобных аминокислотных остатков, участвующих в формировании молекулярной поверхности, на гидрофильные: D2A, Q22K, G25S, R26K, N202H, R206E, I207L, S209G, S210T, что предотвратило ассоциацию белковых молекул в водном растворе. У модифицированного CYP2C5 сохранилась ферментативная активность, что позволяет предполагать отсутствие значительных изменений структуры активного центра и мест взаимодействия с белками-партнерами. Так как CYP2C5 имеет значительно более высокую гомологию с другими P450 эукариот, использование его трехмерной структуры в качестве образца для компьютерного моделирования других эукариотических P450 более обоснованно. Ранее нами было показано, что на основе гомологии с CYP2C5 (при идентичности > 40%) может быть выполнено компьютерное моделирование пространственной структуры 78 различных P450 эукариот [16] включая CYP2B4.

Целью данной работы было построение новой, более точной модели CYP2B4, пригодной как для моделирования взаимодействий с белками-партнерами, так и для выполнения компьютерных экспериментов по модификации молекулярной поверхности с целью уменьшения ее гидрофобности. Основное внимание уделяли оптимизации структурных элементов, формирующих поверхность белка, а также проверке соответствия модели экспериментальным данным и оценке ее достоверности с помощью специализированными компьютерными программами.

МЕТОДИКА. Молекулярное моделирование, энергетическую оптимизацию и молекулярную динамику осуществляли с помощью программного комплекса Sybyl 6.4 (Tripos Inc., St.Louis, США) [17] на рабочей графической станции O2 и сервере Origin200 (Silicon Graphics Inc., Mountain View, США). Первичная структура CYP2B4 получена из банка SwissProt (код P00178) [18]. Для моделирования по гомологии использовали трехмерные структуры белков из банка PDB [9], пространственную структуру и аминокислотную последовательность белка-гомолога CYP2C5 (PDB код 1dt6) [3]. Построение пространственной структуры CYP2B4 выполнено в два этапа:

1. Моделирование структуры CYP2B4 по гомологии и оптимизация полученной модели;
2. Верификация полученной модели с помощью специализированных программ и сравнения с экспериментальными данными.

Моделирование пространственной структуры CYP2B4 по гомологии

В последовательности CYP2B4 был удален N-концевой фрагмент (аминокислотные остатки 1-30), соответствующий мембранной части белка, который также редуцирован у белка-образца - модифицированного CYP2C5. С помощью модуля Composer [17] программного комплекса Sybyl был выполнен сравнительный анализ белковых последовательностей CYP2C5 и CYP2B4 и определены структурно-консервативные участки (SCR) в последовательности CYP2B4. Трехмерные координаты для их моделирования взяты из гомологичных им участков CYP2C5. Поиск пептидных петель, трехмерные координаты которых могут быть использованы для построения структурно-вариабельных участков (SVR), был выполнен в PDB.

Встраивание гема в модель CYP2B4 было выполнено путем его копирования из молекулы CYP2C5. Гем был описан с использованием стандартных типов атомов и химических связей, представленных в поле сил Tripos [18].

Оптимизация модели.

Оптимизацию полученной модели трехмерной структуры CYP2B4 проводили в несколько этапов.

Минимизацию энергии модели выполняли методом Powell [17] с использованием параметров поля сил Tripos [18]. Заряды были рассчитаны методом Gasteiger-Huckell [19].

Моделирование молекулярной динамики в водной фазе осуществляли с использованием алгоритма Verlet [17] в два этапа при постоянных величинах объема и полной энергии системы: 1) 30 пс с шагом 0,1 фс, 2) 100 пс с шагом 1,0 фс. Предварительно к молекуле белка были добавлены 902 молекулы воды. Окончательная минимизация энергии модели выполнена после удаления растворителя.

Верификация модели

На каждом этапе моделирования осуществили проверку соответствия модели существующим представлениям о структурной организации цитохромов P450 [10]. Идентификацию элементов вторичной структуры проводили с помощью программы ProTable [17] программного комплекса Sybyl. Верификацию модели осуществляли с помощью программы Procheck [20] путем оценки стереохимических параметров полипептидной цепи и каждого аминокислотного остатка. Кроме того, модель была проверена на соответствие известным экспериментальным данным о химических модификациях поверхностных аминокислот и местах взаимодействия с партнерами и субстратами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. *Моделирование пространственной структуры CYP2B4 по гомологии и встраивание гема*

При выравнивании последовательностей CYP2C5 и CYP2B4 с помощью программы Composeg в CYP2B4 были найдены 16 участков, соответствующих SCR (рис. 1). Высокая степень идентичности последовательностей (51%) позволила значительно увеличить протяженность найденных SCR и включить в их состав основные структурные элементы (α -спирали и β -слои) CYP2C5, характерные для всех цитохромов P450 [10]. Следует отметить, что значительная часть N-концевой области также оказалась в составе SCR1 и SCR2 (рис. 1), что не могло быть достигнуто ранее при использовании бактериальных P450 в качестве белков-образцов. Трехмерные координаты для построения SCR модели CYP2B4 были взяты из соответствующих участков CYP2C5.

Высокая степень идентичности белка-образца позволила значительно снизить протяженность структурно-вариабельных участков (SVR) последовательности CYP2B4, не вошедших в состав SCR, по сравнению с моделированием на основе бактериальных P450 (их длина не превышала 30 остатков). Так, например, моделирование SVR4 и SVR12 на участках Gln91-Arg120 (30 остатков) и Phe365-Leu392 (27 остатков) (рис. 1) не вызвало затруднений, т.к. степень идентичности была достаточной для использования CYP2C5 в качестве источника для трехмерных координат. Несмотря на то, что в пространственной структуре CYP2C5 находится участок (Trp212 - Leu222), координаты которого не установлены PCA, моделирование SVR8 CYP2B4 на участке Ser207-Gly229 (23 остатка) было возможно при использовании пространственных координат бактериальных P450.

Добавление простетической группы (гема) выполнено совмещением полученной модели CYP2B4 с пространственной структурой CYP2C5, копированием гема в CYP2B4 и образованием связи Fe-S с Cys436. Гем, являясь системой сопряженных псевдоароматических связей, имеет плоскую структуру и связан с молекулой белка за счет образования координационной связи между атомом железа и атомом серы Cys436. Атом железа соединен 2 ковалентными и 2 координационными связями с атомами азота. Так как такое представление гема в поле сил Tripos [17] приводит к деформации гетероколец и потере плоской формы при минимизации и моделировании молекулярной динамики белка, то для

Sequence 1: CYP2B4 (model)

Sequence 2: CYP2C5 (1DT6)



Рисунок 1.

Выравнивание аминокислотных последовательностей CYP2B4 и CYP2C5 [3] с помощью программы Composer (Sybyl, Tripos Inc.). Параметры выравнивания: идентичность: 51.0 %; значимость: 69.9; штраф за разрыв: 8; матрица замен: pmutation.homo

сохранения плоской структуры гем был представлен как система конъюгированных ковалентных двойных связей, а атомы азота - как плоские аминные.

Оптимизация полученной модели.

Оптимизация модели CYP2B4 с помощью процедуры молекулярной динамики в водном окружении показала, что ее пространственная структура стабильна. Система белок-вода наименее стабильна на начальном этапе (см. рис. 2 А, Б), когда при незначительных колебаниях полной энергии системы потенциальная энергия растет, а кинетическая падает в течение 30 пс. В то же время, моделирование молекулярной динамики позволило найти за счет небольших конформационных изменений наиболее устойчивые конформации боковых цепей аминокислотных остатков. На рис. 2 представлены изменения RMS (В) и радиуса колебаний молекулы белка (Г) в процессе молекулярной динамики, указывающие на стабильность модели.

Последующий анализ вторичной структуры показал, что упаковка белковой цепи достаточно плотная и содержит все основные структурные элементы, характерные для известных пространственных структур P450 [10] (рис. 1, 3).

Верификация модели.

Первоначальная проверка на наличие стерических конфликтов и

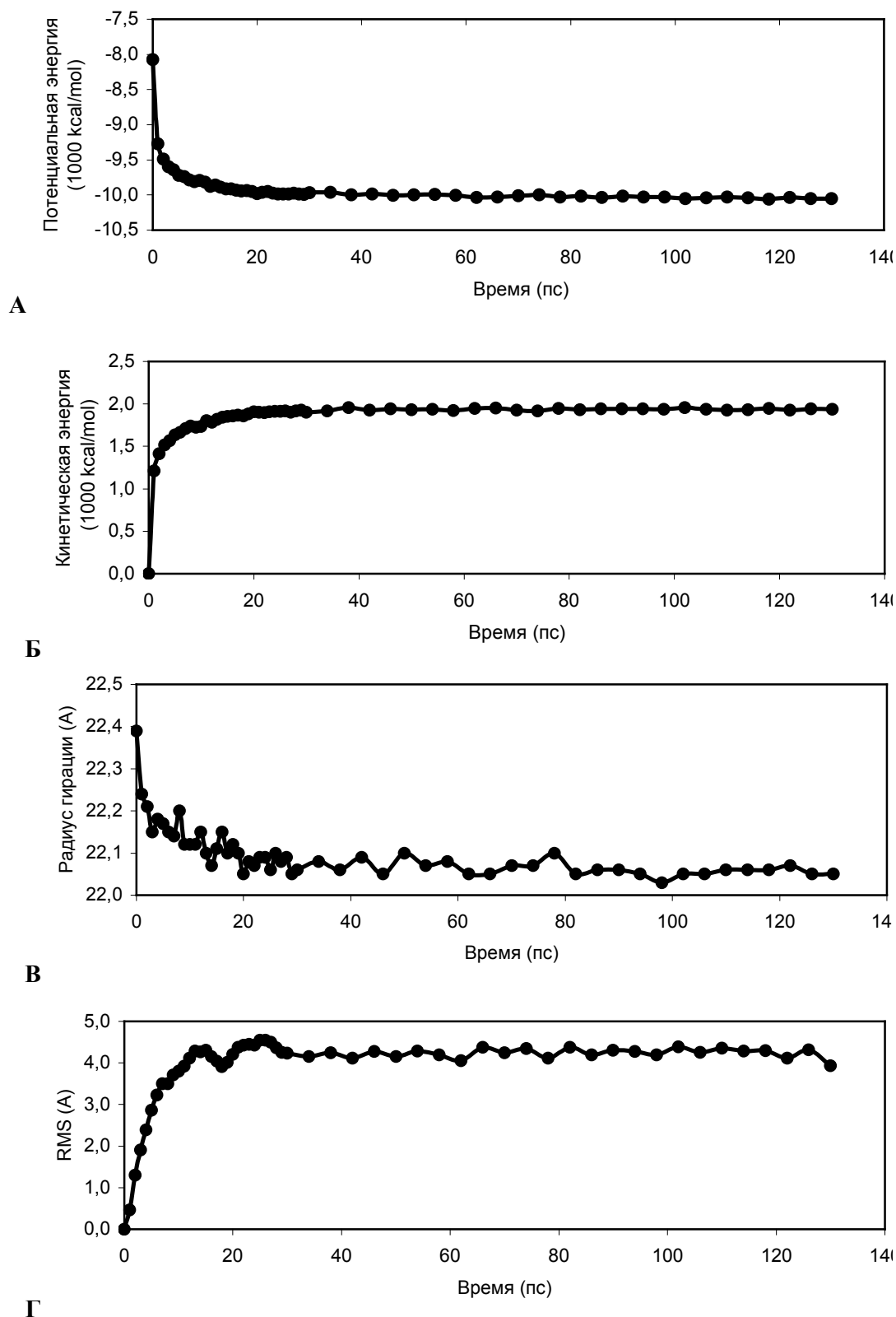


Рисунок 2.

Изменение энергетических параметров и параметров расстояний системы «CYP2B4 - вода» в процессе молекулярной динамики. А - изменение потенциальной энергии, Б - изменение кинетической энергии, В - изменение радиуса гирации атомов, Г - изменение RMS атомов.

правильности фолда с помощью модуля Protable [17] программного комплекса Sybyl выполнялась на каждом этапе построения модели. Модуль Protable продемонстрировал отсутствие значительных искажений конформации пептидной цепи, что свидетельствует об отсутствии грубых стерических конфликтов и недопустимых внутримолекулярных взаимодействий.

Более детальная верификация модели выполнена с помощью программы Procheck [20]. Статистика стереохимических параметров и расчет карт Рамачандрана, выполненные программой Procheck, базируются на результатах анализа 163 кристаллических структур негомологичных белков из различных классов (PDB) [21] с разрешением не хуже 2,0 Å и значениями R-фактора (отклонение расчетной величины электронной плотности от экспериментальной) не более 20% [20]. Результаты этой статистической обработки показывают, что любая исследуемая пространственная структура белка является достаточно достоверной при условии, что не менее 90% ее аминокислотных остатков (кроме остатков глицина и пролина) находятся в областях наиболее благоприятных значений ϕ/ψ углов.

Для выявления возможных особенностей CYP2C5 (1dt6) был выполнен анализ Procheck Ramachandran Plot пространственных структур известных P450, используемых для моделирования по гомологии (табл. 1). Расчет карт Рамачандрана для структуры CYP2C5 (1dt6) с разрешением 2,5 Å показал, что только 71,3% аминокислотных остатков находятся в областях наиболее благоприятных значений. Это значение несколько ниже, чем у известных пространственных структур водорастворимых цитохромов P450 (табл. 1). Причины, вызывающие эти расхождения, могут быть связаны с различием условий кристаллизации и последующего анализа белков (R-фактор и разрешение кристалла), а также с тем, что CYP2C5 является мембранным белком и имеет отличия в структуре фолда и свойствах поверхности.

Таблица 1. Параметры карт Рамачандрана (Procheck) цитохромов P450 с известной пространственной структурой.

P450 (PDB-индекс)	CYP101 (2cpp)	CYP102 (2hpd)	CYP107 (1oxa)	CYP108 (1cpt)	CYP2C5 (1dt6)
Разрешение PCA (Å)	1,63	2,0	2,1	2,3	3,0
R-фактор (%)	19,0	16,7	19,6	18,9	23,8
Разрешение Procheck (Å)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
A, B, L (%)	91,7	88,4	90,5	89,0	71,3
A, b, l, p (%)	8,3	10,5	9,2	10,4	23,4
~a, ~b, ~l, ~p (%)	0,0	0,7	0,3	0,6	3,6
XX (%)	0,0	0,4	0,0	0,0	1,8

Обозначения: A, B, L - области наиболее предпочтительной геометрии; a, b, l, p - области допустимой геометрии; ~a, ~b, ~l, ~p - области условно допустимой геометрии; XX - области условно недопустимой геометрии; A, a, L, l, p - спиральные структуры; B, b - β -складчатые структуры.

Расчет карт Рамачандрана модели пространственной структуры CYP2B4 (см. табл. 2) показал, что 77,3% ϕ/ψ углов основной цепи находятся в области наиболее благоприятных значений. Это также несколько ниже, чем у известных пространственных структур водорастворимых цитохромов P450 и может быть объяснено вышеперечисленными особенностями белка-образца.

В модели пространственной структуры CYP2B4 обнаружено всего 6 аминокислотных остатков с недопустимой геометрией. Это связано с тем, что координаты одного из них (Ser334) взяты из структуры CYP2C5 в составе SCR10, другие (Ala92; Lys161; Arg378; Glu403; Glu423) получены при автоматическом поиске петель среди гомологичных участков белков в PDB. Проверка показала, что

МОДЕЛЬ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ ЦИТОХРОМА P450 2B4

эти участки белков имеют в своем составе соответствующие аминокислотные остатки с условно допустимой геометрией. Однако эти неточности не являются существенными, так как данные аминокислоты не участвуют ни в связывании субстрата [22], ни во взаимодействии с белками-партнерами.

Таблица 2. Сравнение данных статистики Procheck Ramachandran Plot для моделей CYP2B4 на основе CYP2C5 и CYP102.

Модель	CYP2B4 (1dt6)	CYP2B4 (2hpd)
Разрешение Procheck (Å)	2,5	2,5
A, B, L (%)	77,3	65,6
a, b, l, p (%)	19,6	27,0
~a, ~b, ~l, ~p (%)	2,3	3,8
XX (%)	0,8	3,6
NN / non-Gly, non-Pro	491/397	422/366

Обозначения: A, B, L - области наиболее предпочтительной геометрии; a b, l, p - области допустимой геометрии; ~a, ~b, ~l, ~p - области условно допустимой геометрии; XX - области условно недопустимой геометрии; A, a, L, l, p - спиральные структуры; B, b - β -складчатые структуры.

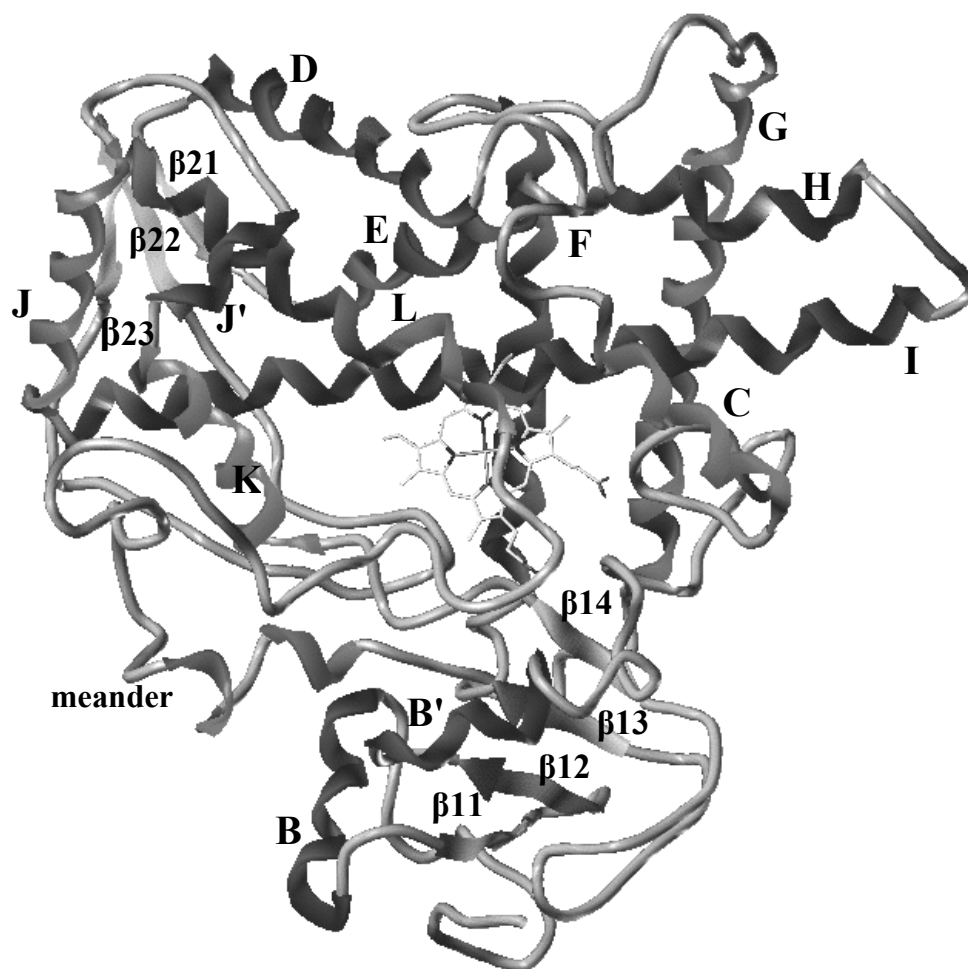


Рисунок 3.

Модель пространственной структуры CYP2B4 после окончательной оптимизации с помощью молекулярной динамики и энергетической минимизации. Темным обозначены SCR, более светлым - SVR.

Ранее Gotoh [22] выявил группы аминокислотных остатков, ответственных за распознавание субстрата (SRS, substrate recognition regions) и формирующих

полость около гема в CYP2B4. Анализ соответствующих участков в модели CYP2B4 показал, что они совпадают с описанными Gotoh, что подтверждает корректность полученной модели пространственной структуры CYP2B4 и указывает на возможность ее использования для поиска новых лигандов.

Также с использованием методов химической модификации, флуоресцентных меток и направленного мутагенеза были определены некоторые поверхностные и функциональные группы аминокислот CYP2B4. Так было показано, что Cys152 [23], Lys49, Lys100, Lys139, Lys144, Lys251, Lys384 и Lys433 [24] расположены на поверхности молекулы. Анализ построенной нами модели показал, что данные аминокислотные остатки находятся на ее поверхности. Анализ взаимодействий CYP2B4 с белками партнерами и данных направленного мутагенеза позволяет выявить несколько групп аминокислот на поверхности белка. Результаты представлены на рис. 4. В состав первой группы входят остатки Arg122, Arg126, Arg133, Phe135, Met137, Lys139 и Lys433 [25], которые сгруппированы на проксимальной стороне глобулы CYP2B4 и формирующие место связывания с цитохромом b_5 (CYB5) (рис. 8А). Место связывания NADPH-зависимой цитохром P450 редуктазы (P450R) образован остатками первой группы, Arg422 и Arg443, расположенными также на проксимальной стороне [25] (рис. 4 Б). Третья группа сформирована остатками Phe223, Lys225, His226, Phe227, Arg232, Phe244, Arg253 и Tyr235, расположенными на дистальной стороне (рис. 4 В), которые обеспечивают взаимодействия CYP2B4 с P450R за счет гидрофобных и электростатических сил и, предположительно, участвуют в переносе электрона [26].

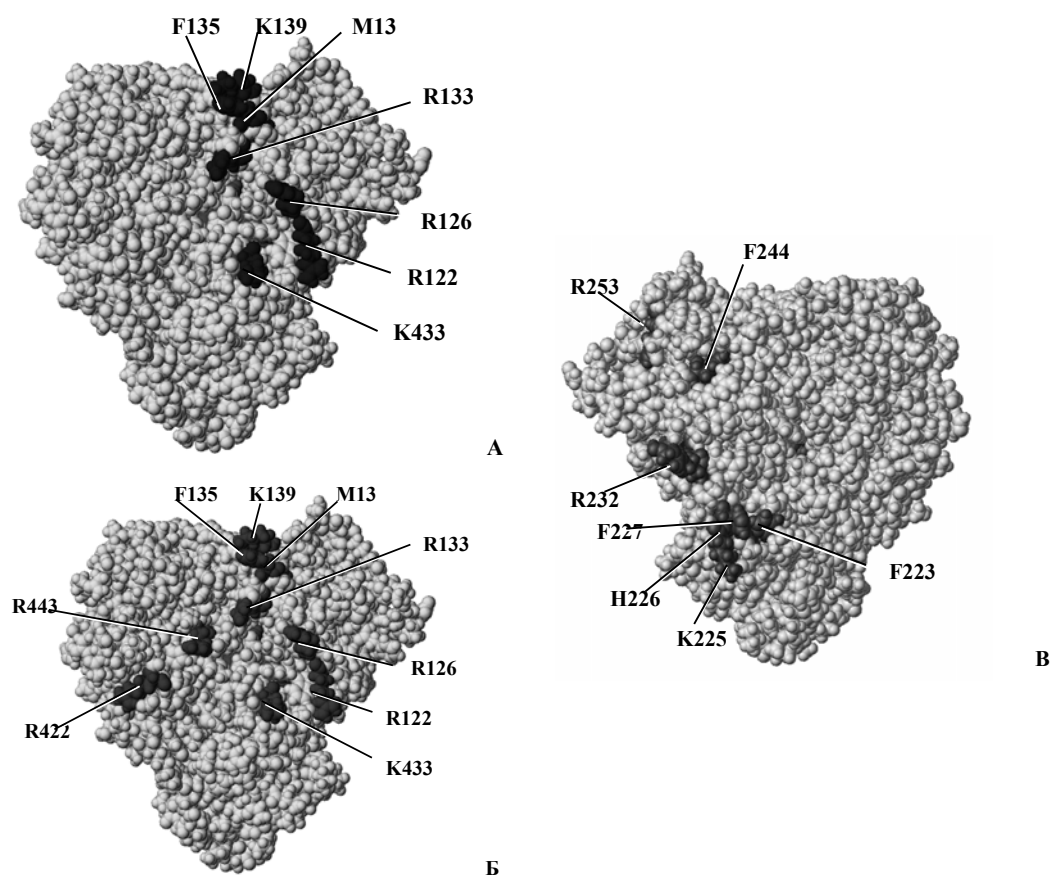


Рисунок 4.
Места взаимодействия CYP2B4 с партнерами: Цит b_5 [25] (А) и P450R (Б, В) [25, 26].

МОДЕЛЬ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ ЦИТОХРОМА P450 2B4

Таким образом, имеющиеся на настоящее время экспериментальные данные подтверждают корректность полученной модели пространственной структуры CYP2B4.

Сравнение новой модели CYP2B4 (на основе CYP2C5) с моделью, построенной ранее [13-14] (на основе CYP102 [10]), показало, что значительно изменились длина и состав SCR (рис. 5). Например, низкая степень гомологии с CYP102 вызывала затруднения при моделировании участка Phe223-Leu293. Модель на основе CYP2C5 имеет в своем составе два SCR, которые отсутствуют в

Sequence 1: модель cyp2b4 (CYP102)

Sequence 2: модель cyp2b4 (CYP2C5)

Sequence 3: Cyp2C5 (1dt6)

```

.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....110
.....LGSRPVVVLCGTDAIREALVDQAEAFSGRGKIAVVDPIFQG
PPGPSPLPVLGNLLQMDRKGLLRSFLRLREKYGDVFTVYLGSRPVVLCGTDAIREALVDQAEAFSGRGKIAVVDPIFQG
PPGPTPFPIIGNLLQIDAKDIKSLTKFSECYGPVFTVYLGMPKPTVVHLHGYEAVKEALVDLGEFFAGRGVSPILEKVSKG
          SCR1      SCR2      SCR3      1      2      3

.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190
YGVIFANGERWRALRRFSLATMRDFGMGKRSVEERIQEERCLVEELRKSGALLDNTLLFHSITSNIICSIVFGKRFDY
YGVIFANGERWRALRRFSLATMRDFGMGKRSVEERIQEERCLVEELRKSGALLDNTLLFHSITSNIICSIVFGKRFDY
LGIAFSNAKTWKEMRRFSLMTLRNFGMGKRSIEDRIQEERCLVEGLRKTNASPCDPTFILGCAPCNVICSIVFHNRFDY
          SCR4      4      5      SCR5      6      SCR6      7

.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270
KDPVFLRLDLLFFQSFSLSISSFSQVFELFPGFLKHFPGTHRQIYRNQLQEINTFIGQSVEKHRATLDPSNPRDFIDVYLL
KDPVFLRLDLLFFQSFSLSISSFSQVFELFPGFLKHFPGTHRQIYRNQLQEINTFIGQSVEKHRATLDPSNPRDFIDVYLL
KDEEFLKLMESLHENVELLGT.....P.....LDYFPGIHKTLKNADYIKNFIMEKVKEHQKLLDVNNPRDFIDCFIL
          SCR7      8      SCR8      SCR9

.....280.....290.....300.....310.....320.....330.....340.....350
RMEKDKSDPSSEFHHQNLILTVLSLFFAGTETTSTTLRYGFLMLKYPHVTERVQKEIEQVIGSHRPPALDDRAKMPYTD
RMEKDKSDPSSEFHHQNLILTVLSLFFAGTETTSTTLRYGFLMLKYPHVTERVQKEIEQVIGSHRPPALDDRAKMPYTD
KMEQ.....ENNLEFTLESVLIAVSDLFAGTETTSTTLRYSLLLLLKHPEVAARVQEEIERVIGRHRSPCMQDRSRMPYTD
          SCR10      9

.....360.....370.....380.....390.....400.....410.....420.....430
AVIHEIQRLGDLIPFGVPHTVTKDTQFRGYVIPKNTEVFVPLSSALHDPYFETPNTFNPGHFLDANGALKRNEGFMPPFS
AVIHEIQRLGDLIPFGVPHTVTKDTQFRGYVIPKNTEVFVPLSSALHDPYFETPNTFNPGHFLDANGALKRNEGFMPPFS
AVIHEIQRFIDLLPTNLPHAVTRDVRFRNYFIPKGTDIITSLTSVLHDEKAFNPVKVDPGHFLDESNGFKKSDYFMPPFS
          SCR11 10      11      SCR12 12      SCR13

.....440.....450.....460.....470.....480.....490.....500.....510
LGKRICLGEGIARTEFLFFTTILQNFASIAPVPPEDIDLTPRESGVGNVPPSYQIRFLAR..
LGKRICLGEGIARTEFLFFTTILQNFASIAPVPPEDIDLTPRESGVGNVPPSYQIRFLAR..
AGKRMCVGEGLARMELFLFTSILQNFKLQSLVEPKDLDTAVVNGFVSVPVPSYQLCFIPINH
          SCR14 13      SCR15      SCR16 14

```

Рисунок 5.

Сравнение SCR двух моделей CYP2B4 (на основе CYP102 и CYP2C5). Параметры выравнивания последовательностей CYP2B4 и CYP2C5: идентичность: 51,0%; значимость: 69,9; штраф за разрыв: 8; матрица замен: pmutation homo. Параметры выравнивания последовательностей CYP2B4 и CYP102: идентичность: 20,8%; значимость: 17,6; штраф за разрыв: 8; матрица замен: pmutation homo.

предыдущей модели и значительно более короткие SVR. Кроме того, все основные элементы вторичной структуры входят в состав SCR, в то время как, в старой модели спирали А и В (Leu43-Gln45 и Leu51-Tyr62) не вошли в состав SCR. Это объясняется тем, что раньше моделирование N-концевого фрагмента было затруднено, из-за низкой степени идентичности с бактериальным белком-образцом и осуществлялось, начиная с 70-го аминокислотного остатка. Это указывает на то, что новая модель CYP2B4 более корректна и имеет большую точность.

Для сравнения укладки белковой последовательности двух моделей выполнено совмещение трехмерных структур по наиболее консервативным фрагментам пептидной цепи, отвечающим за связывание гема и формирование спирали L (рис. 6). Было выявлено, что новая модель, построенная на основе CYP2C5, имеет более плотную упаковку белковой глобулы с более выраженной «пирамидальной» формой белковой глобулы, характерной для всех известных структур цитохромов P450. Более высокий уровень сходства CYP2B4 и CYP2C5 позволил включить в новую модель значительную часть N-концевого фрагмента, примыкающего к мембранному якорю (30-70 аминокислотные остатки).



Рисунок 6.

Сравнение фолда и строения двух моделей пространственной структуры CYP2B4, построенных на основе CYP102 (более темный) и CYP2C5 (более светлый).

Сравнение выравниваний нашей модели и модели, полученной группой Лоев [12], также выявило качественные и количественные отличия между SCR моделей, связанные с особенностями белков-образцов. Построение суперпозиции моделей и подробное сравнение вторичных структур не представляется возможным по причине отсутствия в свободном доступе пространственных координат модели Loew [15].

Сравнение карт Рамачандрана двух моделей на основе CYP2C5 и CYP102 представлено в таблице 2. Эти данные наглядно демонстрируют различное качество моделей. Использование белка с высокой степенью сходства в качестве образца позволило добиться более высокой точности построения новой модели пространственной структуры CYP2B4. Сравнение результатов верификации двух моделей с помощью программы Procheck показало, что в новой модели значительно больше аминокислотных остатков, имеющих наиболее благоприятную геометрию. В то время как, в новой модели всего 6 аминокислотных остатков имеют недопустимую геометрию, в старой модели их 13 и 6 из них (Ile107, Arg120, Leu121, Arg236, Asp361, Thr471) входят в состав SRS [22], что значительно снижает качество модели. Сравнение расположения функциональных элементов на поверхности белка [23-26] в моделях показало, что старая модель не обладает достаточной точностью, в то время как новая модель более пригодна для целей моделирования поверхностных мутаций, направленных на гидрофилизацию молекулы белка. Так, например, аминокислотные остатки Arg122 и Arg126, отвечающие за связывание CYP2B4 с Cyt b5 P450R [25], расположены внутри глобулы в отличие от новой модели (рис. 4А, Б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Получена новая модель пространственной структуры цитохрома CYP2B4 на основе гомологии со структурой цитохрома CYP2C5 [3]. Модель согласуется с известными экспериментальными данными о топологии белка и элементах его поверхности. Ее стереохимические параметры не противоречат данным, полученным на основе анализа структур белков из PDB. По сравнению с более ранней моделью, построенной на основе CYP102 [10], удалось достигнуть более высокой точности и корректности моделирования. Полученная модель может быть использована для последующего моделирования точечных мутаций, направленных на гидрофилизацию поверхности белка с целью получения его водорастворимой формы.

Данная работа была выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты РФФИ 99-04-48754 и 01-04-06550).

Авторы благодарны фирмам Tripos GmbH (Мюнхен, Германия) и NC Group (Россия) за научную и техническую поддержку.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shimoji M., Yin H., Higgins L., Jones J.P., Biochemistry 1998, 37, 25, 8848-8852.
2. Kolesanova E.F., Kiselar J.G., Jung C., Kozin S.A., Hui Bon Hoa G., Archakov A.I. (1996) Biochimie. **78**, 752-762.
3. Williams P.A., Cosme J., Sridhar V., Johnson E.F., McRee D.E. (2000) J. Inorg. Biochem., **81**, 183-190.
4. Moul J. (1999) Curr. Opin. Biotech., **10**, 583-588.
5. Clothia C., Lesk A.M. (1986) EMBO. J., **5**, 823-827
6. Venclovas C., Zemla A., Fidelis K. (1999) Protein, **S1**, 7-13
7. Szklarz G.D., Ornstein R.L., Halpert J.R. (1994) J. Biomol. Struct. Dyn., **12**, 61-78.
8. Poulos T.L., Finzel B.C., Howard A.J. (1987) J Mol Biol., **195**, 687-700.
9. 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.
10. Ravichandran K.G., Boddupalli S.S., Hasermann C.A., Peterson J.A. (1993) Science, **261**, 731-736.
11. Cupp-Vickery J.R., Poulos T.L. (1995) Nat. Struct. Biol., **2**, 144-153.

12. *Hasemann C.A., Ravichandran K.G., Peterson J.A., Deisenhofer J.* (1994) *J. Mol. Biol.*, **236**, 1169-1185.
13. *Ivanov A.S., Skvortsov V.S., Archakov A.I.* (1996) XI International Symposium on Microsomes and Drug Oxidation, Los Angeles, USA, , July 21-24, P133.
14. *Ivanov A.S., Skvortsov V.S., Dubanov A.V., Archakov A.I.* (1996) The First Electronic Molecular Graphics and Modelling Society Conference (MGMS EC-1) on the Internet and World Wide Web, Oct 7-18, http://bellatrix.pcl.ox.ac.uk/mgms/conf/sect_area/pstruct/papers/ivanov2/index.html.
15. *Chang Y.T.; Stiffelman O.B.; Vakser I.A.; Loew G.H.; Bridges A.; Waskell L.* (1997) *Protein Eng.*, **10**, 2, 119-129.
16. *Ivanov A.S., Dubanov A.V., Sechenykh A.A., Skvortsov V.S., Archakov A.I.*, International Workshop «From Sequence to Function: Experimental and Bioinformatic Studies of Cytochrome P450 Superfamily» Moscow, 2000, 3.
17. Sybyl 6.7, Tripos Inc., 1699 South Hanley Road, St Louis, Missouri, 63144, USA.
18. *Bairoch A., Apweiler R.* (2000) *Nucleic Acids Res.*, **8**, 45-48.
19. *Gasteiger J., Marsili M.* (1980) *Tetrahedron*, **36**, 3219-3228 .
20. *Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M.* (1993) *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283-291.
21. *Morris A.L., MacArthur M.W., Hutchinson E.G., Thornton J.M.* (1992) *Proteins*, **12**, 345-364.
22. *Gotoh O.* (1992) *J Biol Chem.*, **267**, 83-90.
23. *Black S.D., Coon M.J.* (1985) *Biochem Biophys Res Commun*, **128**, 82-89
24. *Bernhardt R., Kraft R., Otto A., Ruckpaul K.* (1988) *Biomed. Biochim. Acta*, **47**, 581-92
25. *Bridges A., Gruenke L., Chang Y.T., Vakser I.A., Loew G., Waskell L.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 17036-49.
26. *Lehnerer M., Schulze J., Achterhold K., Lewis D.F., Hlavica P.* (2000) *J. Biochem. (Tokyo)*, **127**, 163-169.

Поступила 10.04.02.

COMPUTER MODEL OF 3D STRUCTURE OF CYTOCHROME P450 2B4.

A.A. Sechenykh¹, A.V. Dubanov¹, A.S. Ivanov¹, A.I. Archakov¹, P. Williams², J. Cosme¹, E.F. Johnson³, D.E. McRee⁴.

¹ Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS, 10, Pogodinskaya str., Moscow, 119992, Russia; fax: (095) 2450857;

² Astex Technology Ltd, 250 Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge, CB4 0WE, UK;

³ The Scripps Research Institute, 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla CA 92037, USA;

⁴ Syrrx, Inc., 10450 Science Center Drive, Suite 100, San Diego, CA 92121, USA.

Cytochromes P450 (CYPs) play an important role in oxidative metabolism of xenobiotics. The three-dimensional structures of CYPs are needed to study structure-function relationships in their molecules and their interaction with partner proteins. Experimental determination of eukaryotic CYPs 3D structures is difficult because of hydrophobic membrane anchors and surface hydrophobic regions that prevent their crystallization. Replacement of surface hydrophobic amino acids by hydrophilic residues without any changes in protein structure and function can help to solve this problem. Such modification can be proposed using the analysis of 3D model of protein.

In this work computer aided 3D structure of microsomal P450 2B4 (CYP2B4) was modeled for the further prediction surface mutations for hydrophilization of the protein surface. The model of 3D structure of CYP2B4 was constructed by homology with CYP2C5. Model optimization was made by energy minimization and molecular dynamics simulation of protein molecule in water environment. The model was verified by using special statistic software and by comparison with the experimental data about substrate recognition site, redox-partner binding sites and chemical modification of protein surface.

Keyword: cytochrome P450, molecular modelling, molecular dynamics, protein structure, computer model