

БИОИНФОРМАТИКА

УДК 577.322.24:577.181.5

©Коллектив авторов

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ МУТАЦИЙ M182T И Q39K В СТРУКТУРЕ β -ЛАКТАМАЗЫ TEM-72 МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Д.С. Щербинин¹, М.Ю. Рубцова², В.Г. Григоренко², И.В. Упоров², А.В. Веселовский^{1}, А.М. Егоров²*

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; тел.: +7-499-245-07-68; эл. почта: veselov@ibmh.msk.su

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Воробьевы горы, 1, стр. 3

Синтез β -лактамаз является одним из наиболее общих механизмов резистентности бактерий к β -лактамным антибиотикам, таким как пенициллины и цефалоспорины. Широкое использование антибиотиков привело к возникновению множества вариантов β -лактамаз с расширенным спектром действия или устойчивым к ингибиторам. У β -лактамаз TEM типа уже описаны мутации 92 аминокислотных остатков. Ряд мутаций являются функциональными и отвечают за расширение спектра субстратной специфичности. Однако роль большинства так называемых сопутствующих мутаций, расположенных вдали от активного центра, остаётся неизученной. В работе методом молекулярной динамики исследовали роль сопутствующих мутаций в структуре β -лактамаз TEM-72, которая содержит две ключевые мутации (G238S, E240K) и две сопутствующие (Q39K, M182T). Показано, что появление ключевых мутаций остатков 238 и 240 приводило к дестабилизации белковой глобулы, что выражалось в увеличении подвижности аминокислотных остатков. Сопутствующие мутации остатков 182 и 39 влияли на структуру белка противоположным образом. Мутация M182T увеличивала устойчивость белковой глобулы, а мутация Q39K оказывала дестабилизирующий эффект. Эта мутация, по-видимому, способствует оптимизации конформационной подвижности β -лактамазы и может влиять на работу фермента.

Ключевые слова: β -лактамаза, TEM-1, TEM-72, мутации, термоинактивация, молекулярная динамика

DOI 10.18097/PBMC20166205527

ВВЕДЕНИЕ

β -Лактамные антибиотики являются бактерицидными соединениями, препятствующими синтезу клеточной стенки бактерий [1]. В ответ на действие этих антибиотиков бактерии выработали разнообразные механизмы резистентности. Одним из этих механизмов является синтез ферментов β -лактамаз, гидролизующих β -лактамное кольцо антибиотика. На основе первичной последовательности β -лактамазы подразделяют на четыре молекулярных класса (A-D) [2]. Классы A, C и D объединяют серин-зависимые β -лактамазы, а ферменты из класса B являются металло-зависимыми и содержат один или два иона цинка в активном центре.

Наиболее распространенными являются β -лактамазы класса A [3-6]. Считается, что эти β -лактамазы произошли из пенициллин-связывающих белков, которые являются природной мишенью β -лактамных антибиотиков [7]. В результате массового применения данных антибиотиков и селективного отбора устойчивых штаммов-продуцентов β -лактамазы постоянно эволюционируют [3, 6]. Эволюция происходит в направлении расширения субстратной специфичности и появления ферментов, которые гидролизуют пенициллины и цефалоспорины, а новые типы – и карбапенемы. Такие ферменты получили название β -лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС), именно они в настоящее время получили наибольшее распространение.

Среди представителей молекулярного класса A семейство β -лактамаз TEM типа является наиболее многочисленным [8, 9]. В настоящее время оно включает около 200 ферментов, которые представляют собой мутантные формы β -лактамазы TEM-1 (первый обнаруженный представитель этого семейства) и содержат от одной до семи аминокислотных замен [10, 11]. β -Лактамазы этого типа имеют сходную пространственную структуру, состоящую из двух субдоменов (один α/β и другой все α , рис. 1) с активным центром, расположенным на границе субдоменов [12] и с двух сторон ограниченным консервативными SDN- и Ω -петлями. Считается, что в катализе принимают участие пять аминокислотных остатков активного центра (S70, K73, S130, E166 и K234), которые проводят реакцию ацилирования-деацилирования, в результате которой разрывается амидная связь β -лактамного кольца. Ключевой группой в этой реакции является гидроксильная группа S70.

У β -лактамаз TEM типа к настоящему времени описаны мутации 92 аминокислотных остатков. Известно, что мутации в четырёх положениях (E104, R164S, R164H, G238S, E240K) являются функциональными (ключевыми) и отвечают за расширение спектра субстратной специфичности. Эти аминокислотные замены происходят около активного центра и способствуют увеличению его размера, чтобы в него могла поместиться объёмная оксиминная группа цефалоспоринов. Однако роль

* - адресат для переписки

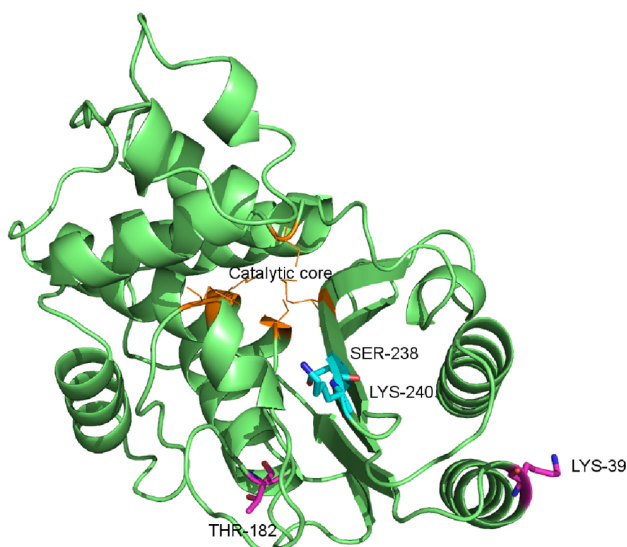


Рисунок 1. Пространственные структуры β -лактамаз TEM-1 и TEM-72. Толстыми линиями отмечены отличающиеся остатки в молекуле β -лактамазы TEM-72: S238, K240 (функциональные мутации), K39 и T182. Тонкими оранжевыми линиями показаны остатки каталитического центра.

множества так называемых сопутствующих мутаций, расположенных вдали от активного центра, остаётся неизвестной. “Платой” за расширение субстратной специфичности у БЛРС является пониженная термодинамическая стабильность белковой глобулы. Ранее было установлено стабилизирующее влияние сопутствующей мутации M182T на варианты TEM с функциональными мутациями G238S и M69I [13-15]. Исследование влияния других сопутствующих мутаций на изменение термостабильности β -лактамаз представляет большой интерес. Одной из таких мутаций является замена Q39K, которая является распространённой, и встречается у ферментов с разными фенотипами. В частности, она присутствует в β -лактамазе TEM-72, наряду с двумя ключевыми мутациями (G238S, E240K), расширяющими субстратную специфичность, и сопутствующей мутацией M182T.

Известные мутации не приводят к изменениям в структуре β -лактамаз, что предполагает, что их влияние на свойства фермента опосредованы изменениями в подвижности белка. Для выявления этих изменений оптимальным методом является моделирование молекулярной динамики. Ранее, с использованием этого метода, было показано, что единичные точечные мутации могут приводить к изменению подвижности различных участков в β -лактамазах TEM-1 [16] и близкородственной к нему β -лактамазе семейства SHV (того же молекулярного класса) [17].

Целью данной работы являлось исследование методом молекулярной динамики роли сопутствующих мутаций в структуре β -лактамазы TEM-72, которая содержит две ключевые мутации (G238S, E240K) и две сопутствующие (Q39K, M182T). Расчёты молекулярной динамики были проведены при двух

температурах (300 К и 400К) для структур β -лактамаз TEM-1, TEM-72 и TEM-72 с обратными заменами K39Q и T182M.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пространственные структуры β -лактамаз TEM-1 и TEM-72 были получены из банка трёхмерных структур PDB (PDBid 1ZG4 и 3P98, соответственно) [18, 19]. Предварительную подготовку структур проводили при помощи программного пакета Sybyl8.1. При помощи этой же программы в структуру β -лактамазы TEM-72 были внесены обратные замены K39Q и T182M. Это проводилось для того, чтобы оценить вклад каждой из мутаций на свойства белка, в котором присутствуют замены, расширяющие субстратную специфичность фермента

Расчёты молекулярной динамики проводили при помощи пакета программ Gromacs-5.1 в явно заданном растворителе (TIP3P). Параметризацию атомов структур проводили с применением силового поля amber99-SB. Для нейтрализации системы использовали ионы Na^+ . На первом этапе проводили последовательную минимизацию системы в вакууме и в растворителе на протяжении 150000 шагов. На следующем этапе был последовательно произведён нагрев системы до 300 К или 400 К и повышение давления с применением nvt и npt ансамблей. Молекулярную динамику проводили на траектории 25 нс с шагом 2 фс.

Анализ полученных траекторий проводился при помощи программ пакета Gromacs-5.1, VMD-1.9.1 и метода главных компонент (PCA, principal component analysis). Для полученных в ходе расчётов траекторий молекулярной динамики проводили анализ среднеквадратичных отклонений (RMSD), флуктуаций аминокислотных остатков (RMSF), количества возможностей образования водородных связей между субдоменами фермента и стабильности элементов вторичной структуры белковой глобулы с помощью программы DSPP. Расчёты проводили на вычислительном сервере ИБМХ с использованием 24 ядер и двух графических ускорителей Tesla.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Кристаллические структуры β -лактамаз TEM-1 и TEM-72 незначительно отличаются друг от друга (величина RMSD составляет 0,68 Å) (рис. 1). Ключевые (функциональные) замены остатков в положениях 238 и 240 в β -лактамазах располагаются в активном центре фермента в месте связывания лигандов, что обуславливает расширение субстратной специфичности. Исследуемые в данной работе аминокислотные остатки в положениях 39 и 182 находятся на значительном удалении (15-20 Å) от активного центра фермента. Аминокислотный остаток 39 локализован на N-концевой спирали α/β -субдомена, а остаток 182 входит в состав одной из спиралей другого субдомена и располагается на противоположной стороне белковой глобулы относительно активного центра фермента.

Поскольку пространственные структуры β -лактамаз TEM-1 и TEM-72 имеют лишь незначительные отличия, то влияние удаленных от активного центра мутаций на свойства фермента должно определяться изменением подвижности участков белковой глобулы. Поэтому для дальнейшего изучения функциональной роли сопутствующих аминокислотных замен были использованы расчёты молекулярной динамики.

Расчёты молекулярной динамики были проведены для следующих структур β -лактамаз: TEM-1, TEM-72, TEM-72 с обратной заменой K39Q (TEM-1_{238,240,182}), TEM-72 с обратной заменой T182M (TEM-1_{238,240,39}) и TEM-72 с двумя обратными заменами K39Q и T182M (TEM-1_{238,240}) (этот вариант соответствует структуре TEM-1, в которой присутствуют только две замены, расширяющие субстратную специфичность) при двух температурах (300 К и 400 К). В результате было получено по 5 траекторий молекулярной динамики различных модификаций β -лактамаз при 300 К и при 400 К.

Изменения значений среднеквадратичных отклонений атомов аминокислотных остатков в ходе динамики представлены на рисунке 2. Видно, что структуры исследуемых белков оставались стабильны. При 300 К значения RMSD выходили на "плато" после 4 наносекунд и в среднем составляли 1,3-1,4 Å (рис. 2А). Принципиальных отличий

в подвижности исследуемых структур при 300 К выявлено не было. Можно только отметить, что при данной температуре значения RMSD для β -лактамазы TEM-72 с одновременно введёнными обратными заменами K39Q и T182M (TEM-1_{238,240}) в первые десять нс были больше, чем у TEM-1, после чего значения сравнялись.

Повышение температуры с 300 К до 400 К приводило к увеличению значений RMSD в среднем на 0,5-0,7 Å для всех пяти исследуемых структур (рис. 2Б); при этом все варианты ферментов оставались стабильны. Стабильность вторичных структур белка была подтверждена с использованием программы DSSP (данные не приведены). Наименьшая величина RMSD получена для β -лактамазы TEM-1; введение двух функциональных мутаций (TEM-1_{238,240}) приводило к увеличению RMSD на 0,5 Å. Это указывает на то, что введение только функциональных мутаций вызывает дестабилизацию структуры β -лактамазы и повышению подвижности белковой глобулы при нагревании. Добавление мутации M182T (TEM-1_{238,240,182}) приводило к снижению величины RMSD, что согласуется с известной особенностью этой мутации к восстановлению устойчивости β -лактамаз TEM типа к термоинаktivации [20]. Однако введение мутации Q39K (TEM-1_{238,240,39}) в вариант фермента с функциональными мутациями оказывало

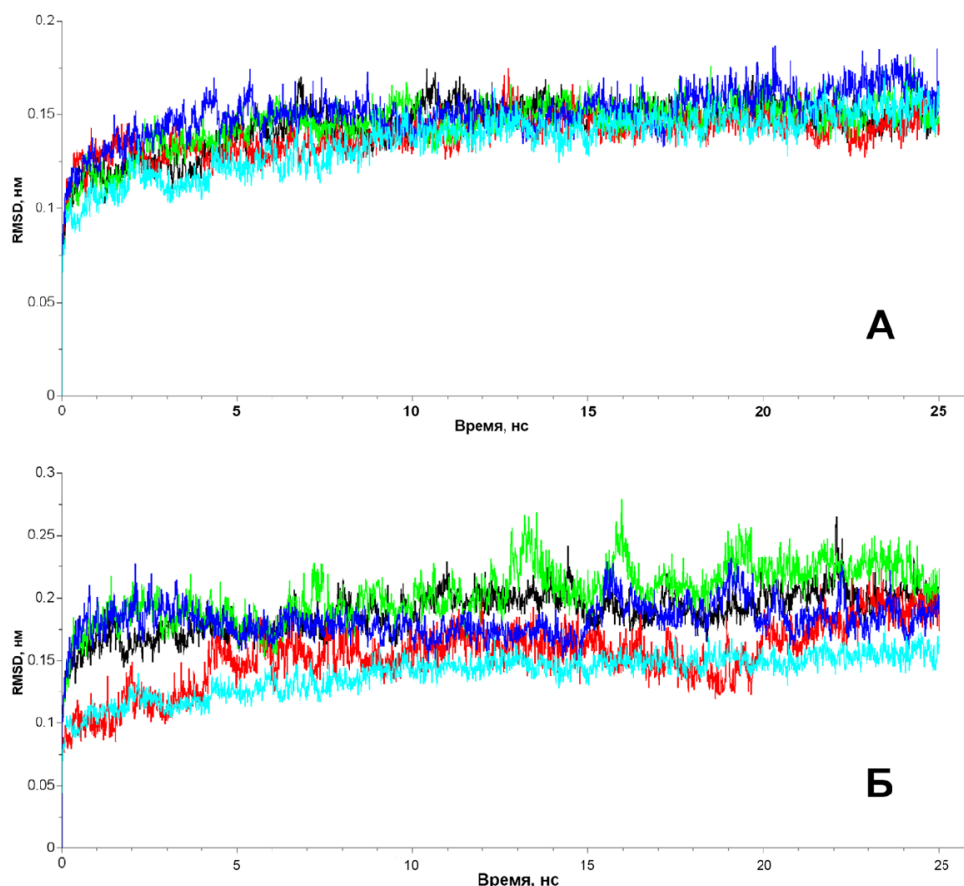


Рисунок 2. Изменение значений RMSD тяжёлых атомов β -лактамаз при молекулярной динамике при 300 К (А) и 400 К (Б). TEM-1 - голубой, TEM-1_{238,240} - синий, TEM-1_{238,240,182} - красный, TEM-1_{238,240,39} - зелёный, TEM-72 - чёрный.

противоположный эффект: величина RMSD возрастала и наблюдались более высокие пики RMSD. Величина RMSD для β -лактамазы TEM-72 (содержит все четыре мутации) занимала среднее положение между вариантами TEM-1_{238,240,182} и TEM-1_{238,240,39} которое сопровождалось сглаженными пиками, что указывает на взаимное влияние сопутствующих мутаций. Полученные результаты свидетельствуют о разнонаправленном влиянии сопутствующих мутаций на поведение белковой глобулы при повышенных температурах.

Поскольку изменение в подвижности белковой глобулы у исследуемых вариантов β -лактамаз наблюдались при 400 К, дальнейший анализ был проведён именно для этой температуры. Для β -лактамаз с различными вариантами замен были рассчитаны флуктуации тяжёлых атомов аминокислотных остатков (RMSF) во время молекулярной динамики. Результаты приведены на рисунке 3. Введение функциональных мутаций (TEM-1_{238,240}), как и ожидалось, приводило к общему увеличению подвижности остатков по сравнению с TEM-1 (различия в величинах в среднем составляло 0,5-0,7 Å, но для некоторых остатков достигало 2 Å) (рис. 3А). Это так же указывало на то, что данные мутации приводят к дестабилизации белковой глобулы и расширению субстратной специфичности. Однако добавление мутации остатка 182 (TEM-1_{238,240,182}) не приводило к существенному снижению подвижности аминокислотных остатков β -лактамазы, за исключением участка 172-179 (С-конец Ω -петли) (рис. 3Б). Влияние другого сопутствующего остатка 39 (TEM-1_{238,240,39}) было более сложным (рис. 3В). В основном, эта дополнительная мутация вызывала незначительное увеличение подвижности радикалов аминокислотных остатков у всего белка, за исключением двух участков, где подвижность была снижена. Первый, как и для введённой мутации 182, участок 170-178, и второй – участок 215-219 (петля, соединяющая Н9 и Н10 [21]). Однако наличие двух сопутствующих мутаций (TEM-72) приводило к увеличению значений RMSF у участка 170-178 (С-конец Ω -петли) и петли Met155-163Asp. Сопоставление величин RMSF для TEM-1 и TEM-72 показало, что аминокислотные остатки в TEM-72 более подвижны, чем у TEM-1 (рис. 3Г). При этом, разница в подвижности ряда остатков, формирующих Ω -петлю у TEM-72, достигала 2 Å, однако в области каталитического остатка 166 различия в подвижности отсутствовали.

Для анализа коллективных движений внутри белковой глобулы исследуемых вариантов β -лактамаз TEM типа применялся метод главных компонент. Результаты PCA показали, что в ходе динамики происходит смещение скользящего типа участков, сформированных α -спиралями относительно β -листа. При этом, смещения первого и второго участков относительно β -слоя являются противоположно направленными (один – по часовой стрелке, другой – против), в результате чего молекула “скручивается”. Подобное скручивание β -лактамазы отмечалось ранее [21, 22]. Наибольшие отличия

в коллективных движениях у мутантных форм β -лактамазы TEM-72 наблюдались для участка Asn170-Arg178. Этот участок является С-концевой частью Ω -петли, которая считается важной для связывания субстратов и их гидролиза. Ω -петлю часто делят на три независимые части: малоподвижную, структурированную N-концевую (R161-W165), центральную (E166-N170), представляющую собой спираль с каталитическим E166 и С-концевую часть (E171-R178). Подвижность петли Asn170-Arg178 представлена на рисунке 4. В β -лактамазе TEM-1 С-концевая часть совершала движение от полузакрытого к открытому состоянию. Добавление функциональных мутаций остатков G238S и E240K (TEM-1_{238,240}) не приводило к изменению характера движения этой части Ω -петли. Введение дополнительно замены M182T (TEM-1_{238,240,182}) вызывало замораживание движения петли в закрытом состоянии, и остатки этой петли начинали контактировать с основной глобулой. Напротив, добавление замены Q39K в последовательность β -лактамазы TEM-1_{238,240} (TEM-1_{238,240,39}) приводило к увеличению амплитуды колебаний этого участка от закрытого к открытой конформации. Это поведение петли сохраняется и в β -лактамазе TEM-72. Ранее отмечалось, что этот участок Ω -петли может совершать большие колебания, в том числе, в ряде случаев этот участок может взаимодействовать с основной белковой глобулой, заполняя полость между Ω -петлей и основной глобулой белка [23].

ОБСУЖДЕНИЕ

Ферменты β -лактамаз класса А имеют жёсткую белковую глобулу, хорошо структурированную и оптимизированную для гидролиза пептидной связи в β -лактамном кольце антибиотика. Применение антибиотиков расширенного спектра и ингибиторов β -лактамаз привело к появлению множества вариантов этих ферментов. К настоящему времени известно около 200 вариантов β -лактамаз TEM типа, выделенных из клинических штаммов, которые включают фенотипы БЛРС и ингибитор-устойчивые формы и отличающихся от β -лактамазы TEM-1 заменами одного или нескольких аминокислотных остатков [10, 24]. Ранее было показано, что приобретение способности к гидролизу цефалоспоринов или устойчивости к ингибиторам сопровождается снижением термодинамической стабильности этого фермента [25]. Например, замена остатка 238 приводит не только к расширению спектра гидролизуемых субстратов, но и снижению температуры термоинактивации на 5 градусов [16]. Одновременно, в β -лактамазах часто присутствуют сопутствующие мутации, которые никак не сказываются на расширении субстратной специфичности или устойчивости к ингибиторам. Считается, что некоторые из них способствуют правильной укладке белковой цепи или стабилизируют устойчивость глобулы, сниженной в результате ключевой (функциональной) мутации [13, 26, 27].

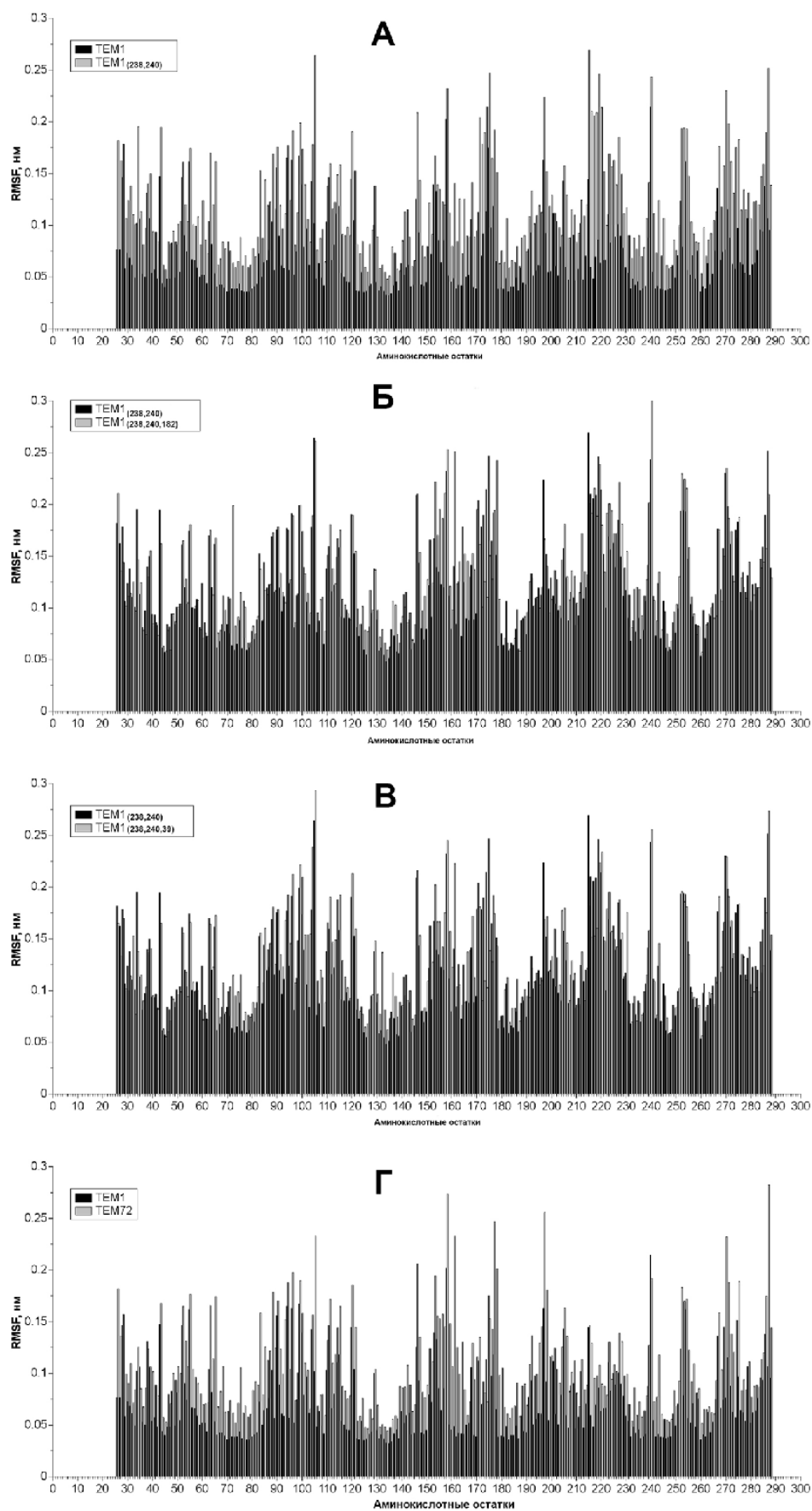


Рисунок 3. Графики значений RMSF β -лактамаз при 400 К: А - TEM1 и TEM-1_{238,240}; Б - TEM-1_{238,240} и TEM-1_{238,240,182}; В - TEM-1_{238,240} и TEM-1_{238,240,39}; Г - TEM-1 и TEM-72.

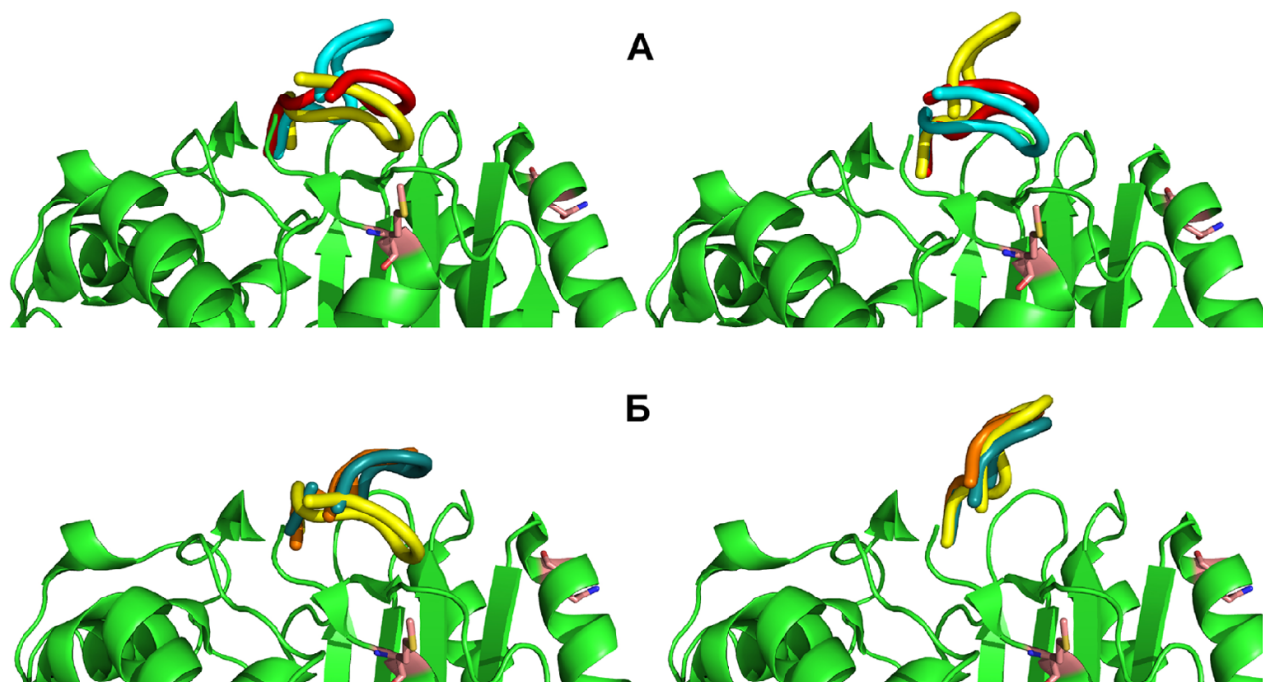


Рисунок 4. Подвижность петли Asn170-Arg178. А - жёлтым цветом обозначена петля β -лактамазы TEM-72, голубым - TEM-1_{238,240,39}, красным - TEM-1_{238,240,182}. Б - жёлтым цветом обозначена петля в β -лактамазе TEM-72, оранжевым - TEM-1, цианом - TEM-1_{238,240}.

В настоящее время установлены две такие мутации, действующие как глобальные супрессоры (компенсаторные мутации, которые стабилизируют функционально измененный фермент): M182T и L201P [13, 28]. Однако функции многих других сопутствующих мутаций остаются неизвестными. В исследованном в данной работе варианте β -лактамазы TEM-72, кроме функциональных мутаций (G238S и E240K) и сопутствующей (M182T) присутствует мутация Q39K с неизвестной функцией. Впервые она была обнаружена в β -лактамазе TEM-2, но она не влияет на спектр гидролизуемых субстратов [29].

Молекулярная динамика при нормальной температуре (300 K) не приводила к каким-либо заметным изменениям как в исходных вариантах β -лактамаз TEM-1 и TEM-72, так и вариантах с только функциональными мутациями (TEM-1_{238,240}) и с добавлением к ним одной сопутствующей мутации (TEM-1_{238,240,182} и TEM-1_{238,240,39}). Различия стали наблюдаться только при повышении температуры моделирования до 400 K. В ходе молекулярной динамики исследуемых вариантов TEM взаиморасположение каталитических остатков на всей траектории остается неизменным даже при повышенной температуре (400 K). С учётом того, что процесс гидролиза антибиотиков β -лактамазами является диффузионно-лимитированным [30], это может указывать на то, что изменение активности мутантных форм фермента определяется изменением эффективности связывания субстрата в активном центре за счёт изменения подвижности или конформации остатков, участвующих

в транспорте субстрата в активный центр или определяющие их адаптацию структуры активного центра к структуре субстрата.

Анализ подвижности белков показал, что введение только функциональных мутаций (TEM-1_{238,240}) приводило к дестабилизации структуры фермента (рис. 1 и 2). Добавление сопутствующей мутации 182 (TEM-1_{238,240,182}), как и ожидалось, приводило к снижению подвижности глобулы, тогда как мутация 39 (TEM-1_{238,240,39}) вызывала дальнейшую дестабилизацию глобулы. Совмещение всех четырёх мутаций в β -лактамазе TEM-72 приводит к варианту, белковая глобула которого более подвижна по сравнению с ферментом TEM-1.

Анализ коллективных движений исследуемых вариантов β -лактамаз показал, что α -спиральные участки глобулы совершают противоположно направленные вращательные движения. Однако изменений в этом движении при введении различных мутаций обнаружено не было. Ранее вращательные движения были отмечены при моделировании молекулярной динамики TEM-1 [21] и было высказано предположение, что такое движение может влиять на конформацию и подвижность Ω -петли.

Наибольшие отличия в движениях между исследуемыми вариантами были обнаружены в С-концевой части Ω -петли. Причём, если функциональные мутации (TEM-1_{238,240}) не влияли на движение петли, то сопутствующие мутации изменяли её поведение. Мутация M182T (TEM-1_{238,240,182}) приводила к снижению подвижности петли и её фиксации в закрытом положении, тогда как мутация Q39K (TEM-1_{238,240,39}) вызывала

увеличение амплитуды колебания. Совмещение двух этих мутаций в β -лактамазе TEM-72 сохраняло поведение петли аналогично варианту TEM-1_{238,240,39}. Ранее неоднократно было показано, что как положение С-концевого участка Ω -петли, так и её подвижность существенно влияет на активность β -лактамаз [31-35]. Поэтому, наблюдаемое изменение поведения петли в ходе молекулярной может влиять на активность фермента.

Таким образом, влияние исследованных мутаций на структуру β -лактамазы TEM-1 можно представить следующим образом. Появление мутаций в положениях 238 и 240 приводит не только к расширению субстратной специфичности, но и снижению термодинамической устойчивости белка. Закрепление в структуре мутации M182T стабилизирует белковую глобулу, но, по-видимому, одновременно вызывает снижение активности фермента за счёт снижения конформационной подвижности участков белка, связанных с транспортом и связыванием субстрата в активном центре. Появление мутации Q39K, которая, скорее всего, является дестабилизирующей, вызывает обратное расслабление структуры, что вероятно может приводить к увеличению активности фермента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведено исследование роли двух сопутствующих мутаций в β -лактамазе TEM-72 методами молекулярной динамики. Показано, что появление ключевых (функциональных) мутаций остатков 238 и 240 приводит к дестабилизации белковой глобулы. Сопутствующие мутации остатков 182 и 39 влияют на структуру этого белка противоположным образом. Мутация M182T увеличивает устойчивость белковой глобулы при нагревании, тогда как мутация Q39K является дестабилизирующей. Последняя мутация, по-видимому, нужна для оптимизации конформационной подвижности β -лактамазы и может влиять на эффективность расщепления субстратов.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №15-14-00014.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tipper D.J., Strominger J.L. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **54**, 1133-1141.
2. Ambler R.P. (1980) Philos. Trans. R. Soc. Lond. B, **289**, 321-331.
3. Bush K. (2013) Ann. N.Y. Acad. Sci., **1277**, 84-90.
4. Livermore D.M. (2012) Korean J. Int. Med., **27**, 128-142.
5. Рубцова М.Ю., Уляшова М.М., Бахман Т.Т., Шмид Р.Д., Егоров А.М. (2010) Успехи биол. химии, **50**, 303-348.
6. Tang S.S., Apisarnthanarak A., Hsu L.Y. (2014) Adv. Drug Deliv. Rev., **78**, 3-13.
7. Frere J.M., Joris B. (1985) CRC Crit. Rev. Microbiol., **11**, 299-396.
8. Medeiros A.A. (1997) Clin. Infect. Dis., **24**, S19-S45.
9. Matagne A., Lamotte-Brasseur J., Frere J.M. (1998) Biochem. J., **330**, 581-598.
10. <http://www.lahey.org/studies>
11. Pimenta A.C., Fernandes R., Moreira I.S. (2014) Mini Rev. Med. Chem., **14**, 111-122.
12. Fisher J.F., Meroueh S.O., Mobashery S. (2005) Chem. Rev., **105**, 395-424.
13. Huang W., Palzkill T. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94**, 8801-8806.
14. Farzaneh S., Chaibi E.B., Peduzzi J., Barthelemy M., Labia R., Blazquez J., Baquero F. (1996) Antimicrob. Agents Chemother., **40**, 2434-2436.
15. Sideraki V., Huang W., Palzkill T., Gilbert H.F. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 283-288.
16. Giampaolo A.D., Mazza F., Daidone I., Amicosante G., Perilli M., Aschi M. (2013) Biochem. Biophys. Res. Commun., **436**, 666-671.
17. Baig M.H., Sudhakar D.R., Kalaiarasan P., Subbarao N., Wadhawa G., Lohani M., Khan M.K., Khan A.U. (2014) PLoS ONE, **9**, e112456.
18. Stec B., Holtz K.M., Wojciechowski C.L., Kantrowitz E.R. (2005) Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr., **61**, 1072-1079.
19. Docquier J.D., Benvenuti M., Calderone V., Rossolini G.M., Mangani S. (2011) Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun., **67**, 303-306.
20. Brown N.G., Pennington J.M., Huang W., Ayvaz T., Palzkill T. (2010) J. Mol. Biol., **404**, 832-846.
21. Fisette O., Morin S., Savard P.-Y., Lague P., Gagne S.M. (2010) Biophys. J., **98**, 637-645.
22. Fisette O., Gagne S., Lague P. (2012) Biophys. J., **103**, 1790-1801.
23. Roccatano D., Sbardella G., Aschi M., Amicosante G., Bossa C., Di Nola A., Mazza F. (2005) J. Comput.-Aided Mol. Des., **19**, 329-340.
24. Paterson D.L., Bonomo R.A. (2005) Clin. Microbiol. Rev., **18**, 657-686.
25. Wang X., Minasov G., Shoichet B.K. (2002) J. Mol. Biol., **320**, 85-95.
26. Mitraki A., Fane B., Haase-Pettingell C., Sturtevant J., King J. (1991) Science, **253**, 54-58.
27. Shortle D., Lin B. (1985) Genetics, **110**, 539-555.
28. Marciano D.C., Pennington J.M., Wang X., Wang J., Chen Y., Thomas V.L., Shoichet B.K., Palzkill T. (2008) J. Mol. Biol., **384**, 151-164.
29. Bradford P.A. (2001) Clin. Microbiol. Rev., **14**, 933-951.
30. Hardy L.W., Kirsch J.F. (1984) Biochemistry, **23**, 1275-1282.
31. Palzkill T., Le Q.-Q., Venkatachalam K.V., LaRocco M., Ocera H. (1994) Mol. Microbiol., **12**, 217-229.
32. Vakulenko S.B., Toth M., Taibi P., Mobashery S., Lerner S. (1995) Antimicrob. Agents Chemother., **39**, 1878-1880.
33. Petrosino J.F., Palzkill T. (1996) J. Bacteriol., **178**, 1821-1828.
34. Delmas J., Robin F., Bittar F., Chanal C., Bonnet R. (2005) Antimicrob. Agents Chemother., **49**, 4280-4287.
35. Stojanoski V., Chow D.-C., Hu L., Sankaran B., Gilbert H.F., Prasad B.V., Palzkill T. (2015) J. Biol. Chem., **290**, 10382-10394.

Поступила: 13. 09. 2016.
Принята к печати: 19. 09. 2016.

INVESTIGATION THE ROLE OF MUTATIONS M182T AND Q39K IN STRUCTURE OF β -LACTAMASE TEM-72 BY MOLECULAR DYNAMICS METHOD

D.S. Shcherbinin¹, M.Yu. Rubtsova², V.G. Grigorenko², I.V. Uporov², A.V. Veselovsky¹, A.M. Egorov²

¹Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel.: +7-499-245-07-68; e-mail: veselov@ibmh.msk.su

²Lomonosov Moscow State University, Chemical Department, 1, bld. 3 Vorobievsky Gory, Moscow, Russia

Synthesis of β -lactamases is one of the common mechanisms of bacterial resistance to β -lactam antibiotics including penicillins and cephalosporins. The widespread use of antibiotics results in appearance of numerous extended-spectrum β -lactamase variants or resistance to inhibitors. Mutations of 92 residues of TEM type were found. Several mutations are the key mutations that determine the extension of spectrum of substrates. However, roles of the most associated mutations, located far from active site, remain unknown. We have investigated the role of associated mutations in structure of β -lactamase TEM-72, which contain two key mutation (G238S, E240K) and two associated mutations (Q39K, M182T) by means of simulation of molecular dynamics. The key mutation lead to destabilization of the protein globule, characterized by increased mobility of amino acid residues at high temperature of modelling. Mutation M182T lead to stabilization protein, whereas mutation Q39K is destabilizing mutation. It seems that the last mutation serves for optimization of conformational mobility of β -lactamase and may influence on enzyme activity.

Key words: β -lactamase, TEM-1, TEM-72, mutations, thermoresistance, molecular dynamics