НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.25

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДИНАМИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФОТОРЕГУЛИРУЕМЫХ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗ ЬРАС И ОаРАС

Мария Сергеевна Курышкина^{1, 2}, Анна Михайловна Кулакова^{1, 2}, Александр Александрович Московский^{1, 2}, Мария Григорьевна Хренова^{1, 2}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

² Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

Автор, ответственный за переписку: Мария Григорьевна Хренова, khrenovamg@my.msu.ru

Аннотация. В работе проведено сравнение фоторегулируемых аденилатциклаз bPAC и OaPAC методами классической молекулярной динамики в состояниях до и после облучения светом. Определены пути передачи сигнала из фоторецепторного в каталитический домен. Большее ускорение каталитической реакции в результате облучения светом в случае bPAC обусловлено как смещением равновесия в сторону закрытой конформации, так и более значительным увеличением числа субоптимальных путей аллостерической передачи сигнала от одного домена к другому.

Ключевые слова: аденилатциклаза, аллостерическая регуляция, молекулярная динамика, динамический сетевой анализ

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2024-65-4-306-311

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-73-20032).

Для цитирования: Курышкина М.С., Кулакова А.М., Московский А.А., Хренова М.Г. Сравнительный анализ динамического поведения бактериальных фоторегулируемых аденилатциклаз bPAC и OaPAC // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2024. Т. 65. № 4. С. 306–311.

ORIGINAL ARTICLE

COMPARATIVE STUDY OF THE DYNAMIC BEHAVIOR OF BACTERIAL PHOTOREGULATED ADENYLATE CYCLASES BPAC AND OAPAC

Maria S. Kuryshkina^{1, 2}, Anna M. Kulakova^{1, 2}, Alexander A. Moskovsky^{1, 2}, Maria G. Khrenova^{1, 2}

¹Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia ²N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Corresponding Author: Maria G. Khrenova, khrenovamg@my.msu.ru

Abstract. Photoregulated adenylate cyclases bPAC and OaPAC are compared using classical molecular dynamics simulations in both states, before and after blue light irradiation. The pathways of signal transduction from the photoreceptor to the catalytic domain are determined. The more pronounced acceleration of the catalytic reaction rate as a result of light irradiation in the case of bPAC is explained both by a shift

[©] Курышкина М.С., Кулакова А.М., Московский А.А., Хренова М.Г., 2024

307

in equilibrium towards a closed conformation and by a larger number of suboptimal pathways of allosteric signal transduction from photoreceptor to catalytic domain.

Keywords: adenylate cyclase, allosteric regulation, molecular dynamics, dynamic network analysis

Financial Support. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 19-73-20032).

For citation: Kuryshkina M.S., Kulakova A.M., Moskovsky A.A., Khrenova M.G. Comparative Study of the Dynamic Behavior of Bacterial Photoregulated Adenylate Cyclases bPAC and OaPAC // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2024. T. 65. № 4. S. 306–311.

Сенсорные фоторецепторы лежат в основе светозависимых адаптивных механизмов живых организмов. Используемые в оптогенетике сенсорные фоторецепторы – генетически закодированные инструменты тонкого и обратимого управления клеточными процессами. Изучение структуры и свойств природных фоторецепторов способствует развитию в области создания искусственных систем с настраиваемой светозависимой функцией, что значительно расширяет возможности оптогенетики, позволяя направленно регулировать такие процессы в клетке, как экспрессия генов, рекомбинация ДНК, активность ферментов, каскады передачи сигнала и др. [1].

Циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) является аллостерическим эффектором протеинкиназ и ионных каналов. Контроль концентрации цАМФ позволяет осуществить тонкую настройку различных биологических процессов. В частности, цАМФ, будучи важным посредником в регуляции выработки инсулина, делает эту молекулу привлекательной мишенью при лечении диабета. В качестве инструмента контроля концентрации цАМФ может быть использована оптогенетическая система на основе фотоактивируемой аденилатциклазы (РАС), катализирующей реакцию превращения аденозинтрифосфата $(AT\Phi)$ в цАМФ с высвобождением пирофосфата [2]. В частности, высокогомологичные РАС бактерий Beggiatoa acuminata (bPAC) и Oscillatoria acuminata (OaPAC) благодаря малым размерам и низкой активности в невозбужденном состоянии представляют особой интерес в качестве фоторецептора оптогенетических систем. Однако, если в случае bPAC повышение скорости ферментативной реакции при фотовозбуждении возрастает на два порядка и не зависит от времени возбуждения, то для OaPAC скорость возрастает на один порядок и зависит от времени возбуждения. Это отличие может быть следствием изменения механизма фоторегуляции в зависимости от системы [3].

Согласно результатам молекулярного моделирования и ИК-спектроскопии при воздействии синего света на фоторецепторный домен фермента BLUF (blue light using flavin) хромофорная группа флавинмононуклеотида (FMN) не претерпевает никаких изменений, в то же время боковая цепь консервативного глутамина Gln49 хромофор-связывающего кармана таутомеризуется из амидной формы в имидную с вращением вокруг одинарной связи С-С. Предполагается, что данное изменение в структуре фоточувствительного домена инициирует конформационные переходы, лежащие в основе аллостерической регуляции активности фермента [4]. Ранее было установлено, что консервативный Arg278 активного сайта принимает различные конформации в состоянии до облучения светом (темном, D) и фотоактивированном (светлом, L), стабилизируя переходное состояние реакции [5].

В настоящей работе с помощью методов молекулярного моделирования выполнен сравнительный анализ ферментов OaPAC и bPAC. Для сравнения конформационных пространств этих систем было проведено молекулярно-динамическое (МД) моделирование. С помощью полученных МД-траекторий посредством динамического сетевого анализа определены потенциальные пути аллостерической регуляции ферментов: аминокислотные остатки Gln49 и Arg278 были выбраны в качестве начальной и конечной точек соответственно.

Методы расчета

В качестве основы для получения полноатомных моделей ферментов bPAC и OaPAC в темном (D) и светлом (L) состояниях были выбраны кристаллические структуры PDB ID 5M2A и 5MBD, 4YUT и 5X4T из банка данных PDB. Для каждой из структур плохо разрешенные в ходе рентгеноструктурного анализа аминокислотные остатки были добавлены по данным о первичной последовательности (UniProtA7BT71 и K9TLZ5). Атомы водорода добавляли с помощью программы Reduce в соответствии с нейтральным pH.

Полученные полноатомные модели белка с FMN сольватировались молекулами воды в прямоугольной ячейке так, чтобы расстояние от белковой молекулы до границ ячейки составляло не менее 20 Å. Далее для нейтрализации общего заряда в систему добавляли ионы хлора.

Для каждой из систем проведено МДмоделирование с использованием программного пакета NAMD [6]. При описании белковой макромолекулы использовано силовое поле СНАRMM36 [7], для FMN и имидной формы глутамина Gln49 ферментов в L-состоянии – СGenFF [8], для молекул воды – ТІРЗР [9]. Предварительно для релаксации сольватной оболочки и добавленных аминокислотных остатков был выполнен расчет траекторий с фиксированным положением атомов белка и FMN длиной 0,5 нс. В качестве стартовых структур для расчета МД были использованы структуры ближайшего локального минимума, полученные методом градиентного спуска. Все расчеты проводили в каноническом ансамбле NPT при давлении p = 1 атм и температуре T = 300 К, которые поддерживали с помощью баростата Нозе – Гувера и термостата Ланжевена соответственно. Шаг интегрирования для всех траекторий составил 1 фс, общая длина равнялась 200 нс для каждой системы.

Полученные МД-траектории обрабатывали с помощью сервиса NetworkView [10] и програм-

мы VMD [11]. В рамках проводимого анализа все тяжелые атомы белка и FMN были разбиты на структурные фрагменты, формирующие вершины графа, которые соединялись ребрами с определенным весом, если атомы соответствующих фрагментов находились на расстоянии менее 4 Å на протяжении 75% и более МД-траектории. Полученный граф разбивался на кластеры наиболее связанных между собой фрагментов с помощью алгоритма Гирвана – Ньюмена [12].

Для каждой системы определены кратчайшие пути между вершинами, относящимся к FMN и связанным с ним аминокислотным остаткам, и вершинами, относящимися к Arg278 и окружающим его аминокислотным остаткам. Оптимальные пути между вершинами определяли с помощью алгоритма Флойда – Уоршелла [13]. Для полного описания системы наряду с оптимальным путем были получены и проанализированы субоптимальные пути, которые определялись как пути, длина которых не превышала длину оптимального пути более чем на 20 ед.

Результаты и обсуждение

Фотоактивируемые аденилатциклазы bPAC и OaPAC – гомодимерные белки, каждая субъединица (А и В) которых состоит из N-концевого фоторецепторного BLUF-домена и С-концевого аденилатциклазного каталитического домена (AC), соединенных перемычкой. АТФ-связывающий карман формируется каталитическими доменами каждой из субъединиц белка. При анализе



Рис. 1. Строение фермента РАС (слева). Распределение усредненного значения характеристических углов φ_A и φ_B (град.) для bPAC и OaPAC в темном (D) и светлом (L) состоянии (справа)

МД-траекторий bPAC и OaPAC в состояниях D и L были обнаружены структуры, соответствующие открытой и закрытой формам АТФ-связывающего сайта. В качестве характеристической координаты этих форм были выбраны два угла: ϕ_A – между Сα-атомами Ala277 каталитического домена субъединицы А, Pro146 перемычки субъединицы А и Ala277 каталитического домена субъединицы В; φ_в – между Сα-атомами Ala277 (A), Pro146 (B) и Ala277 (B) (рис. 1). При переходе из состояния D в состояние L для OaPAC распределение между открытой и закрытой формами АТФ-связывающего сайта не меняется, для bPAC преобладающей становится закрытая форма. Полученные результаты согласуются с экспериментальными данными: закрытая форма связывающего сайта может способствовать связыванию субстрата в более реакционноспособной конформации и, как следствие, преобладание этой формы может привести к повышению активности фермента.

Проведено разбиение на кластеры с помощью динамического сетевого анализа bPAC и OaPAC в темном и светлом состояниях. Для bPAC в обоих состояниях было получено по 7 кластеров. Для OaPAC при переходе от темного состояния к светлому число кластеров увеличилось с 8 до 10. Для Далее для каждой из систем проводили поиск оптимальных путей фоторегуляции. По результатам этого анализа выделены следующие ключевые аминокислотные остатки аллостерического пути переноса сигнала от OaPAC к bPAC: Gln49 \rightarrow Tyr7 \rightarrow Leu75 \rightarrow Glu124 \rightarrow Tyr126 \rightarrow \rightarrow Ala276 \rightarrow Arg278 (рис. 2).

Передача сигнала в фоторецепторном домене весьма консервативна вне зависимости от системы (рис. 3). Пути передачи сигнала как по перемычке между функциональными доменами, так и внутри каталитического домена, более вариативны и зависят от состояния и типа системы. Аминокислотные остатки перемычки Arg121– Glu145 являются ключевыми участниками передачи сигнала, однако при переходе из состояния D в состояние L вероятность прохождения пути через Glu124 и Tyr126 снижается и более часто встречаются остатки Asn136 для bPAC и Ile131 для OaPAC. Наряду с указанными аминокислотными



Рис. 2. Пример кратчайшего пути передачи сигнала с выделенными ключевыми аминокислотными остатками



Рис. 3. Вероятность прохождения пути от флавин-связывающей области BLUF-домена (Glu49) до активного центра AC-домена (Arg278) через заданный аминокислотный остаток bPAC (слева) и OaPAC (справа) в состояниях D (серый) и L (черный)

остатками для каждой из систем становится важным и остаток Ile153. Стоит отметить существенное различие аллостерических путей регуляции bPAC и OaPAC, заключающееся в высокой степени вовлеченности остатков α2-спирали (Glu172–Tyr191), β2 (Glu194–Phe198), и ß3 (Val203-Phe207) листов каталитического домена в состоянии D и L, в частности Phe198 и Val203, принимающих участие в формировании гидрофобного кармана для связывания аденина [14]. Кроме того, распределения вероятности участия в сигнальном пути различаются также у остатков β4 (Thr244–Ser260) и β5 (Met264–Leu269) листов, выстилающих активные сайты каталитических доменов. Для bPAC эти структурные мотивы значительно вовлечены в сигнальные пути, OaPAC соответствует высокая вероятность участия отдельных аминокислот этих структурных фрагментов. Ключевым участником сигнального пути bPAC в темном состоянии β4 и β5 листов является Asp265, при переходе в светлое состояние роль Asp265 становится незначительной. Для OaPAC вне зависимости от состояния важную роль играет остаток His266, при этом при переходе из D в L важный остаток Glu255 с меньшей вероятностью встречается в сигнальных путях. Различия в составе участников сигнальных путей и их изменение при переходе из D в L позволяют объяснить тот факт, что для bPAC в процессе эксперимента наблюдается большее повышение активности при фотовозбуждении, чем для OaPAC.

Длина кратчайшего пути как для bPAC, так и для OaPAC, при переходе к структуре светлого состояния увеличивается. Однако значение длины оптимального пути для bPAC в состоянии как D (203), так и L (246), а также степень ее увеличения оказываются меньшими, чем для OaPAC (251 в D и 368 в L). Кроме того, число субоптимальных путей для bPAC в каждом состоянии (372 в D и 512 в L) и увеличение этого показателя при переходе из одного состояния в другое больше по сравнению с OaPAC (39 в D и 88 в L). Это различие может способствовать большему синергизму по пути аллостерической регуляции для системы bPAC.

Таким образом, в работе рассчитаны и проанализированы разными методами классические молекулярно-динамические траектории. Это дало возможность объяснить изменение скорости реакции при переходе рассматриваемых фоторегулируемых аденилатциклаз OaPAC и bPAC, а также охарактеризовать различия между ними. В bPAC в светлом состоянии равновесие смещается в сторону закрытой конформации, что, вероятно, связано с более эффективной передачей аллостерического сигнала в светлом состоянии

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Losi A. et al. // Chem Rev. 2018. Vol. 118. P. 10659 (DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00163).
- Zhang F., Tzanakakis E.S. // Sci. Rep. 2017. Vol. 7. P. 9357 (DOI: 10.1038/s41598-017-09937-0).
- Stierl M. et al. // J. Biol. Chem. 2011, Vol. 286. P. 1181 (DOI: 10.1074/jbc.M110.185496).
- Domratcheva T., Hartmann E., Schlichting I., Kottke, T. // Sci. Rep. 2016, Vol. 6. 22669 (DOI: 10.1038/ srep22669).
- Khrenova, M.G., Kulakova, A.M., Nemukhin, A.V. // J. Chem. Inf. Model. 2021. Vol. 61. P. 1215 (DOI: 10.1021/acs.jcim.0c01308).
- Phillips J.C. et al. // J. Chem. Phys. 2020. Vol. 153. 044130 (DOI: 10.1063/5.0014475).
- MacKerell A.D. et al. // J. Phys. Chem. B. 1998. Vol. 102. P. 3586 (DOI: 10.1021/jp973084f).

по сравнению с темным. В OaPAC фоторегуляция проявляется слабее, что находит отражение в похожем распределении между закрытой и открытой конформациями, а также в меньшем числе субоптимальных путей переноса сигнала и их изменении при переходе от темного состояния к светлому.

- Vanommeslaeghe K. et al. // J. Comput. Chem. 2010. Vol. 31. P. 671 (DOI: 10.1002/jcc.21367).
- Jorgensen W.L. // J. Chem. Phys. 1983, Vol. 79. P. 926 (DOI: 10.1063/1.445869).
- Eargle J., Luthey-Schulten Z. // Bioinformatics. 2012. Vol. 28. P. 3000 (DOI: 10.1093/bioinformatics/ bts546).
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // J. Mol. Graph. 1996. Vol. 14. P. 33 (DOI: 10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- Van Wart A.T. et al. // J. Chem. Theory Comput. 2014.
 Vol. 10. P. 511 (DOI: 10.1021/ct4008603).
- Floyd R.W. // Commun. ACM. ACM, 1962. Vol. 5.
 P. 345 (DOI: 10.1145/367766.368168).
- 14. Lindner R. et al. // J. Mol. Biol. 2017.Vol. 429.
 P. 1336 (DOI: 10.1016/j.jmb.2017.03.020).

Информация об авторах

Мария Сергеевна Курышкина – аспирант лаборатории квантовой химии и молекулярного моделирования кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, мл. науч. сотр. Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (mariia.kuryshkina@chemistry.msu.ru);

Анна Михайловна Кулакова – доцент кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, мл. науч. сотр. Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (kulakova@lcc.chem.msu.ru);

Александр Александрович Московский – вед. инженер лаборатории квантовой химии и молекулярного моделирования кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, ст. науч. сотр. Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (moskov@rsc-tech.ru);

Мария Григорьевна Хренова – профессор кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, вед. науч. сотр. Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (khrenovamg@my.msu.ru).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных.

Статья поступила в редакцию 10.03.2024; одобрена после рецензирования 16.03.2024; принята к публикации 25.03.2024.