

P19-2006-21

Х. Т. Холмуродов, Д. А. Кретов, А. С. Герасимова*,
Н. А. Колтовая

МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ
ЗАМЕНЫ КОНСЕРВАТИВНОГО ГЛИЦИНА НА СЕРИН
В G-ПЕТЛЕ У МУТАНТА *cdc28-srm* ДРОЖЖЕЙ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ
РЕШЕТКИ КИНАЗЫ CDK2 ЧЕЛОВЕКА

Направлено в журнал «Биофизика»

* Институт молекулярной генетики им. Макса Планка, Берлин

Холмуродов Х. Т. и др.

P19-2006-21

Молекулярно-динамическое моделирование замены консервативного глицина на серин в G-петле у мутанта *cdc28-srm* дрожжей с использованием кристаллической решетки киназы CDK2 человека

Протеинкиназа CDC28 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* служит привлекательной моделью для исследования механизмов регуляции киназ, актуальность изучения которых обусловлена центральной ролью протеинкиназ CDK в регуляции клеточного цикла и высокой частотой нарушения CDK или дерегуляции ингибиторов CDK при злокачественном перерождении клеток млекопитающих. У дрожжей *S. cerevisiae* получены многочисленные температурочувствительные мутации *cdc28*, нарушающие активность киназы CDC28. Мутация приводит к снижению стабильности хромосом и рекомбинантных структур, влияет на митохондриальный мутагенез, радиочувствительность и checkpoint-контроль.

Для анализа структурных изменений, к которым приводит замена CDC28-G20S, использовали кристаллическую структуру киназы человека CDK2. В настоящей работе провели 2-нс молекулярно-динамическое (МД) моделирование кристаллической решетки активного комплекса киназы pT160-CDK2/циклин A/АТФ- Mg^{2+} /субстрат. По данным МД-моделирования структура немутантного и мутантного, включающего замену G16S-CDK2, соответствующую дрожжевой G20S-CDC28, комплексов CDK2 заметно отличаются друг от друга, причем различия структурных конформаций наиболее ярко проявляются именно в тех участках, которые играют ключевую роль для функционирования киназы. На основе результатов компьютерных расчетов рассматриваются структурные элементы, которые могут влиять на киназную активность и регуляторное фосфорилирование, на процессы связывания протеинкиназы с циклинами и субстратами.

Работа выполнена в Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2006

Kholmurodov Kh. T. et al.

P19-2006-21

Molecular Dynamics Simulation of Replacing of Conservative Glycine by Serine in a G-Loop for a Mutant *cdc28-srm* Yeast Using a Crystal Lattice of Kinase CDK2 of the Human

The central role that cyclin-dependent kinases play in the timing of cell division and the high incidence of genetic alteration of CDKs or deregulation of CDK inhibitors in a number of cancers make CDC28 of yeast *Saccharomyces cerevisiae* very attractive model for studies of mechanisms of CDK regulation. For yeast *S. cerevisiae* numerous temperature-sensing mutations *cdc28*, infringing activity of kinase CDC28 are obtained. Major interest is that the mutation *cdc28-srm* is represented by numerous phenotypic manifestations at 30 °C. The mutation results in drop of stability of chromosomes and recombinant structures, influences on a mitochondrial mutagenesis, a radiosensitivity and the checkpoint control. Sequencing analysis of *cdc28-srm* revealed a single nucleotide replacement of glycine by serine in position 20 (G20S).

We used a crystal structure of a human CDK2 kinase protein to analyze the structural changes that are the results of CDC28-G20S substitution. We have performed 2-ns molecular dynamics (MD) simulations on a crystal lattice of an active complex of kinase pT160-CDK2/cyclin A/АТФ- Mg^{2+} /substrate. From the results of MD-simulations the structures of wild-type and mutant (G16S-CDK2) proteins differ noticeably from each other, and the structural conformations are shown to mostly differ in those regions that play a key role in the kinase function. Based on the computer simulation results the influence of the structural conformational changes on the kinase activity and the regulation of phosphorylation are discussed.

The investigation has been performed at the Laboratory of Radiation Biology, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2006

ВВЕДЕНИЕ

Протеинкиназа CDC28 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* относится к семейству циклинзависимых киназ CDK, для активации которых требуется связывание каталитической субъединицы с циклином (Mendenhall, Hodge, 1998). У дрожжей протеинкиназа CDC28 является основной киназой, участвующей в регуляции клеточного цикла, она активируется девятью циклинами: три G1-циклина (Cln1p, Cln2p и Cln3p) участвуют в регуляции событий СТАРТ и шесть циклинов В-типа (Clb1p-Clb6p) участвуют в регуляции S-фазы и митоза. Хотя активация CDK многочисленными циклинами наблюдается и у других организмов, ситуация у дрожжей необычна тем, что циклины различных классов активируют одну и ту же каталитическую субъединицу CDK.

В клетках человека события клеточного цикла управляются несколькими CDK. Киназа CDK4/циклин D необходима для прохождения фазы G1, CDK2/циклин E — для перехода из G1 в S, CDK2/циклин A — для прохождения фазы S, а CDC2(CDK1)/циклин B — для перехода из G2 в M. Две из этих киназ, CDC2 и CDK2, наиболее хорошо изучены. Оба белка проявляют сродство к дрожжевой CDC28(CDK1), гомология аминокислотной последовательности для CDK2 составляет 62 %, а CDC2 — 60 %. На рис. 1 приведены выравненные последовательности киназ человека CDK2 и дрожжей CDC28.

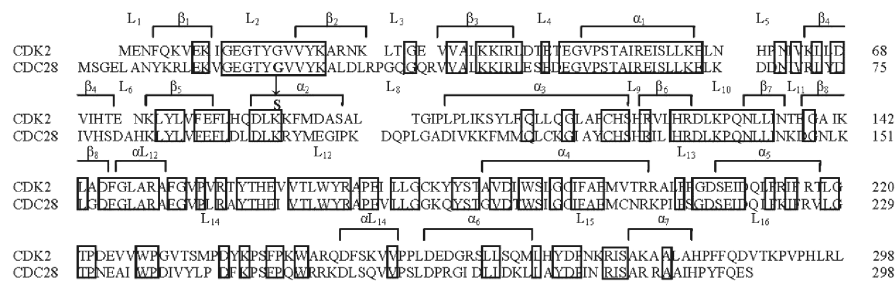


Рис. 1. Выравненные N-концевые фрагменты последовательности циклинзависимых киназ человека (CDK2) и дрожжей *S. cerevisiae* (CDC28). Рамкой обведены остатки, консервативные для четырех киназ — человека (CDK2, CDC2) и дрожжей (cdc2, CDC28). Отмечены элементы вторичной структуры — линкерные области (L) между структурными элементами (β -нити, α -спирали)

Полная активация CDK обычно требует двух событий — связывания с циклинами и последующего фосфорилирования (T160 у CDK2, T169 у CDC28). Подавление активности происходит при связывании с белками-ингибиторами (CKI) и при ингибирующем фосфорилировании (T14 и Y15 у CDK2, T18 и Y19 у CDC28). Таким образом, каталитическая субъединица CDK участвует в многочисленных белок-белковых взаимодействиях: Cdc28p–субстраты, Cdc28p–циклины, Cdc28p–киназы (фосфорилирующие T169 и Y19, САК и SWE1 соответственно), Cdc28p–фосфатазы (дефосфорилирующая Y19-MIN1), Cdc28p–ингибитор (CKI) и, наконец, Cdc28p–АТФ. Кроме того, известно, что каталитическая субъединица киназы Cdc28p взаимодействует еще с продуктом гена *CKS1* (Hadwiger et al., 1989). Этот комплекс обнаруживается в промоторной области и для его функционирования не нужна киназная активность CDC28 (Yu et al., 2005).

Циклинзависимые протеинкиназы CDK относятся к семейству серин-треониновых протеинкиназ. Фермент осуществляет каталитическую передачу γ -фосфата АТФ (рис. 2) на серин или треонин в *S/T – P*-мотиве белковых субстратов. В клетке АТФ существует преимущественно в форме комплексов с ионами Mg^{2+} . Образование таких комплексов обусловлено способностью пирофосфатных групп связываться с двухвалентными катионами, а также высокой концентрацией ионов Mg^{2+} во внутриклеточном пространстве. В большей части ферментативных реакций, в которых АТФ играет роль донора фосфатов, участвует активная форма АТФ, а именно комплекс Mg^{2+} -АТФ.

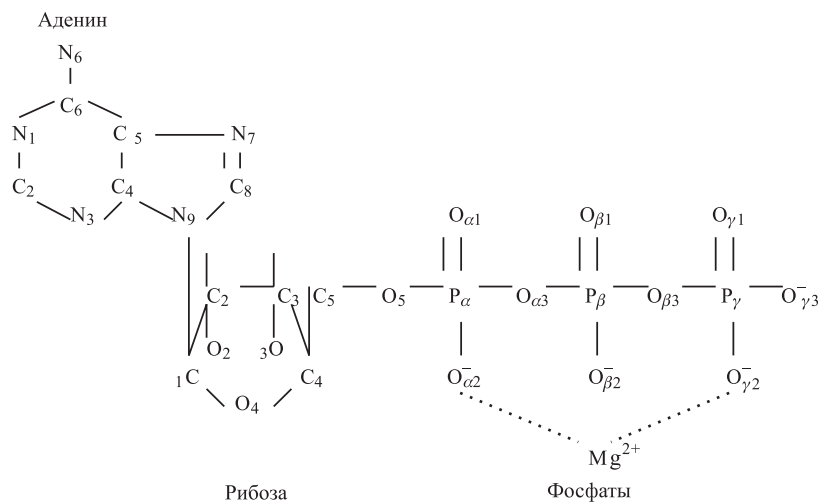


Рис. 2. Структурная формула молекулы аденозин-5'-трифосфата (АТФ). Комплекс АТФ с ионом Mg^{2+}

Анализ кристаллических структур каталитических субъединиц киназ показал, что они имеют схожую структуру. Кристаллическая структура киназы человека CDK2 в составе различных комплексов CDK2/Mg²⁺-ATP (De Bondt et al., 1993) и CDK2/циклин A/ATP (Jeffrey et al., 1995) хорошо изучена и служит моделью киназ, в том числе и для дрожжевой киназы CDC28. Белковая молекула CDK2 состоит из одной полипептидной цепи (298 ост.), образующей компактную структуру, упакованную в два кулака: N-концевой (ост. 1–85), свернутый в β -лист, состоящий из пяти антипараллельных β -нитей (β 1– β 5) и единственной большой спирали (α 1), и более крупный C-концевой (ост. 86–298), по преимуществу состоящий из α -спиралей (рис. 1 и 3).

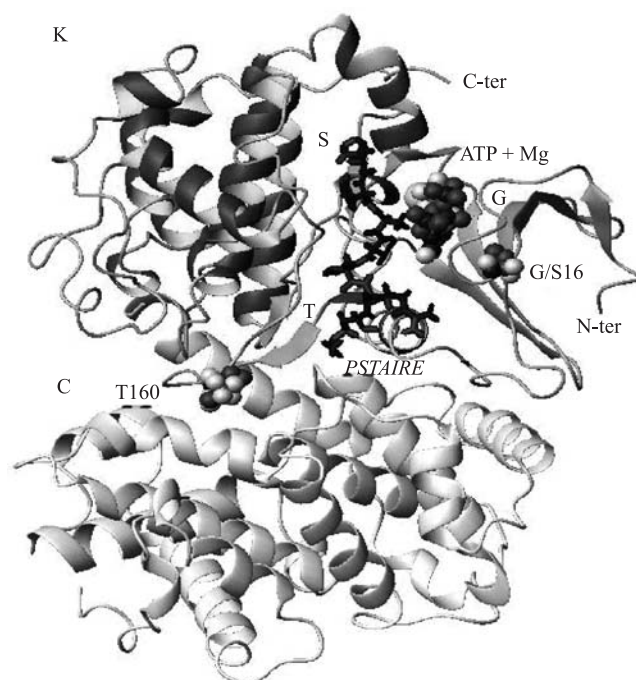


Рис. 3. Кристаллическая структура киназы человека CDK2 (файл 1QMZ из базы данных PDB). Белковый комплекс состоит из киназы (К) и циклина А (С). Используются следующие обозначения: N — N-кулак (ост. 1–85), С — С-кулак (ост. 86–298), G — G-петля (ост. 11–18), Т — Т-петля (ост. 147–167), *PSTAIRE* (ост. 45–51), S — субстрат (HNASPRK), ATP + Mg — комплекс АТФ с ионами магния. Также сферическими атомами изображены аминокислотные остатки Т160, сайт фосфорилирования в Т-петле, и G16, сайт мутационного замещения глицина на серин

Сайт связывания АТФ локализован в глубокой щели между кулаками. Циклин связывается с одной из сторон каталитической щели, взаимодействуя с обоими кулаками CDK2. Каталитическая субъединица CDK2 имеет домен вблизи аминоконца (α_1 -спираль), известный как мотив *PSTAIRE* (ост. 45–56 — CDK2, ост. 52–58 — CDC28). Мутации в этом участке нарушают связывание с циклином. Т-петля (ост. 152–170 — CDK2), блокирующая вход в каталитическую щель в мономерной неактивной форме киназы, также связана с циклином. Это взаимодействие менее сильное по сравнению с *PSTAIRE*, но необходимое для стабилизации комплекса. Каталитические остатки и Т-петля CDK2 подвергаются сильным конформационным изменениям в результате связывания с циклином и фосфорилированием Т160 в Т-петле (Jeffrey et al., 1995). Эти изменения ответственны за увеличение активности в 40 000 раз. Активация киназы происходит в результате конформационных изменений в *PSTAIRE*-спирали, приводящих к сдвигу активных остатков, одновременно со значительным продвижением Т-петли, высвобождающем каталитическую щель. Взаимодействие циклин–Т-петля также вызывает изменение положения Т160, делая его более доступным субстратом для фосфорилирования киназой САК.

У дрожжей *S. cerevisiae* получены многочисленные температурочувствительные мутации *cdc28*, нарушающие активность киназы CDC28. Большой интерес представляет нетемпературочувствительная мутация *cdc28-srm*, имеющая многочисленные фенотипические проявления при 30 °С. Мутация приводит к снижению стабильности хромосом и рекомбинантных структур, влияет на митохондриальный мутагенез, радиочувствительность и checkpoint-контроль (Devin et al., 1990; Koltovaya et al., 1995; 1998). Одним из способов изучения механизма функционирования киназы является анализ структурных особенностей белка и их функциональной значимости. Вследствие широких плейотропных проявлений мутации *cdc28-srm* изучение структурных изменений, вызванных этой мутацией, представляет несомненный интерес.

Проведенное в данной работе секвенирование нуклеотидной последовательности мутантного аллеля *cdc28-srm* показало наличие единственной замены G20S, локализованной в консервативном участке N-конца. Для анализа структурных изменений, к которым приводит замена CDC28-G20S, использовали известную в настоящий момент кристаллическую структуру киназы человека CDK2. Анализ влияния замены консервативного глицина в G-петле CDK2 не проводился и представляет практический интерес, так как протеинкиназы играют центральную роль в регуляции клеточного цикла, и наблюдается высокая частота нарушения CDK или дерегуляция ингибиторов CDK при злокачественном перерождении клеток. Знание структуры и влияния различных структурных элементов на активность киназы позволит подбирать лекарства для соответствующего лечения. В настоящее время активно ведется разработка лекарственных препаратов.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Секвенирование. Выделение геномной ДНК из мутантного и немутантного штаммов проводили по стандартной методике (Winston et al., 1983). Для ПЦР-амплификации (Green, Olson, 1990) кодирующих последовательностей аллелей CDC28 и *cdc28-srm* использовали в качестве матрицы геномную ДНК штаммов 711a (*CDC28*) и *srm5 (cdc28-srm)* (Devin et al, 1990). ПЦР-продукты чистили с помощью специального кита QIAquick PCR (Qiagen, Hilden, Germany) и секвенировали (Casanova et al., 1990), используя олигонуклеотидные праймеры, расположенные приблизительно на расстоянии 200–150 нуклеотидов от рамки считывания. Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили на секвенаторе ABI PRISM 3700 с использованием набора цветных флуоресцентных терминаторов ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer) и AmpliTaq ДНК-полимеразы (Perkin-Elmer) с обоих 5'- и 3'-концов по 2–3 раза для дикого и мутантного аллелей, используя ORF-специфичные праймеры. Последовательность определяли для обеих нитей. Для анализа нуклеотидной последовательности использовали базу данных GenBank.

МД-моделирование. Для МД-моделирования использовали модуль SANDER программного пакета AMBER (Pearlman et al., 1995; Case et al., 2003) для специализированного компьютера MDGRAPE-2 (Narumi et al., 1999; Okimoto et al., 2003). Начальная геометрия комплекса задана согласно кристаллической решетке, полученной с помощью рентгеноструктурного анализа (файл 1QMZ; Brookhaven Protein Data Bank <http://www.pdb.org>).

Компьютерное МД-моделирование включало в себя три последующих этапа (Kholmurodov et al., 2003a; 2003b; Kholmurodov, Ebisuzaki, 2004). На первом этапе осуществляли молекулярно-механическое вычисление минимума энергии кристаллического состояния белка с окружающим водным раствором. Сольватацию системы проводили при помощи процедуры сольватации моделью TIP3P воды в заданном сферическом объеме (Jorgensen et al., 1983). Для расчета длин связей, включающих только атомы водорода, использовали стандартный метод SHAKE (Ryckaert et al., 1977). Второй этап моделирования — нагревание системы с минимальным значением энергии от кристаллического состояния при $T = 0$ К до физиологических температур $T = 300$ К. При этом поиск структуры комплекса, которая отвечала бы минимуму энергии при $T = 300$ К, производился при очень медленном увеличении температуры с шагом около 25 К. Третий этап — непосредственно сам процесс МД-вычисления: после доведения системы до энергетически минимизированных состояний при $T = 300$ К ($t = 0$) температура системы поддерживалась постоянной (300 К) в течение двух миллионов шагов с помощью алгоритма Берендсена со временем релаксации термостата 0,2 пс (Berendsen et al., 1984).

Шаг интегрирования ньютоновских уравнений движения равен 1 фс, а общее время моделирования составило 2000 пс. Были вычислены все атомно-молекулярные взаимодействия, траектории всех атомов и найдена структура всего белкового комплекса. При моделировании CDK2 применили метод атомно-силового поля Корнелла (Cornell et al., 1995). Энергетическое состояние системы или общий потенциал взаимодействия соответствовал равновесному положению системы, в котором силы притяжения уравновешивались силами отталкивания (Kholmurodov, 2005). Учитывались различные типы взаимодействий, стабилизирующих структуру белка: $U(r) = \Sigma K_r (r - r_{eq})^2$ — потенциал внутримолекулярных (валентных) связей; $+\Sigma K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2$ — потенциал угловых связей (вращений); $+\Sigma K_\varphi / 2 (1 + \cos [n\varphi - \gamma])$ — потенциал дигедральных (торсионных) вращений; $+\Sigma [A_{ij} / r_{ij}^{12} - B_{ij} / r_{ij}^6]$ — потенциал невалентных (вандерваальсовых) взаимодействий; $+\Sigma q_i q_j / \epsilon r_{ij}$ — электростатический потенциал.

Результаты моделирования и трехмерные изображения белкового комплекса CDK2 анализировали с помощью программных пакетов RasMol (Sayle, Milner-White, 1995) и MOLMOL (Koradi et al., 1996).

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Секвенирование мутации *cdc28-srm*. Для определения молекулярной природы мутации *cdc28-srm* выделили геномную ДНК из штамма 711a (*CDC28*) и *srm5 (cdc28-srm)* (Devin et al, 1990). Кодирующие последовательности дикого (*CDC28*) и мутантного (*cdc28-srm*) аллелей амплифицировали с помощью ПЦР, используя ORF-специфичные праймеры (см. «Материалы и методы»). Секвенирование нуклеотидной последовательности гена *CDC28* у мутанта *cdc28-srm* показало, что произошла единственная замена глицина на серин в позиции 20 (G20S). Глицин G20-CDC28 локализован в консервативной N-концевой последовательности G15NG17NNG20, так называемой G-богатой петле (рис. 4). Отметим, что один из глицинов, а именно G17, входит в число девяти инвариантов, встречающихся во всех протеинкиназах.

HsCDK2	MENFQKVEKI	GEGTYGVVYKARNK	LTGE	VVAL	KKIRLD	38
HsCDC2	MEDYTKIEKI	GEGTYGVVYKGRHK	TTGQ	VVAM	KKIRLE	38
Spcdc2	MENYQKVEKI	GEGTYGVVYKARHK	LSGR	IVAM	KKIRLE	38
ScCDC28	MSGELANYKRLEKVGEGTYGVVYKALDLRP	GQGQR	VVAL	KKIRLE		45

↓
S

Рис. 4. Выравненные N-концевые фрагменты последовательности циклинзависимых киназ человека и дрожжей (HsCDK2, CDK2 человека; HsCDC2, CDC2 человека; Spcdc2, *cdc2 S. pombe*; ScCDC28, CDC28 *S. cerevisiae*). Обозначена мутация *cdc28-srm* [G20S]

Оба аминокислотных остатка, глицин и серин, относятся к группе полярных незаряженных, однако они различаются своими размерами (глицин небольшого размера, а серин более крупная молекула), хорошо растворяются в воде, так как полярные R-группы (для глицина H^- , для серина OH^-) могут образовывать водородные связи с водой.

Молекулярно-динамическое моделирование киназы. Поскольку трехмерная структура дрожжевой киназы CDC28 не изучена, для моделирования структурных изменений киназы CDC28 мы использовали структуру активного комплекса киназы человека pT160-CDK2/циклин A/ATP- Mg^{2+} (1QMZ) из базы данных PDB. В активный комплекс входят фосфорилированная киназная субъединица pT160-CDK2, активный АТФ, связанный с Mg^{2+} , фрагмент циклина (ост. 173–432) и пентамер субстрата (HNASPRK), содержащий в центральной области сайт фосфорилирования. Комплекс окружен 2287 молекулами воды. Поскольку глицин G20-CDC28 дрожжевой киназы соответствует G16-CDK2 киназы человека, в исходную структуру CDK2 внесли изменение, включив S16 вместо G16, и провели МД-моделирование (см. «Материалы и методы») для обоих комплексов CDK2-G16 и CDK2-S16. Равновесные положения атомов для каждого из комплексов рассчитывали с шагом 1 фс на протяжении 2 нс. За это время комплексы достигли равновесного со-

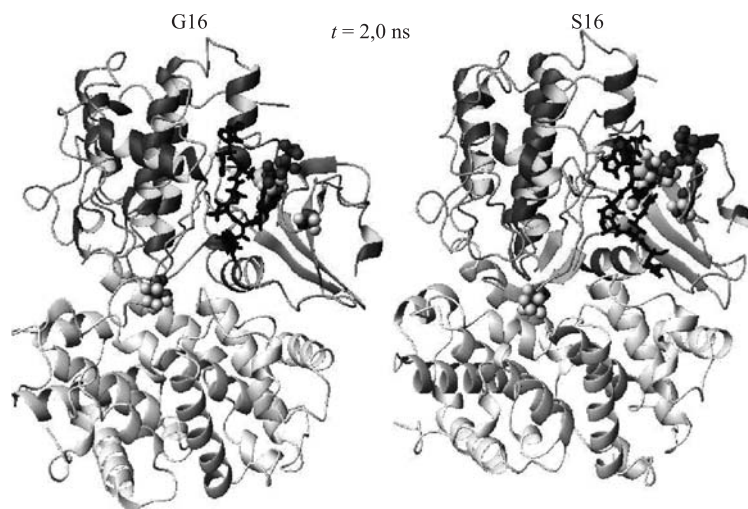


Рис. 5. Конечные структуры конформации по данным молекулярно-динамических расчетов нативного (G16) и мутантного (S16) комплексов CDK2. Конформации белковых структур построены на основе расчета равновесных положений атомов комплексов CDK2 в интервале времени 2 нс, в качестве начальной структуры использовалась структура кристаллической решетки, полученной с помощью рентгеноструктурного анализа

стояния. На рис. 5 представлены конечные конформации немутантного (G16) и мутантного (S16) комплексов CDK2.

Равновесные структуры CDK2-G16 и CDK2-S16 отличаются от их начальных кристаллических решеток. При этом, по данным динамического моделирования, структурные перестройки немутантного (G16) и мутантного (S16) комплексов CDK2 заметно отличаются друг от друга. Более того, следует особо подчеркнуть, что различия в структурных конформациях G16 и S16 наиболее ярко проявляются именно в тех участках, которые, как отмечалось выше, способны играть ключевую роль в процессе активации CDK2, т. е. в механизмах функционирования белковых комплексов. Прежде всего, это конформации АТФ- Mg^{2+} -комплекса, G-, Т-петель и субстрата S (рис. 6). Сравнивая исходные и конечные конформации этих «ключевых фрагментов» нативного и мутантного комплексов CDK2, легко заметить, что G-петля в му-

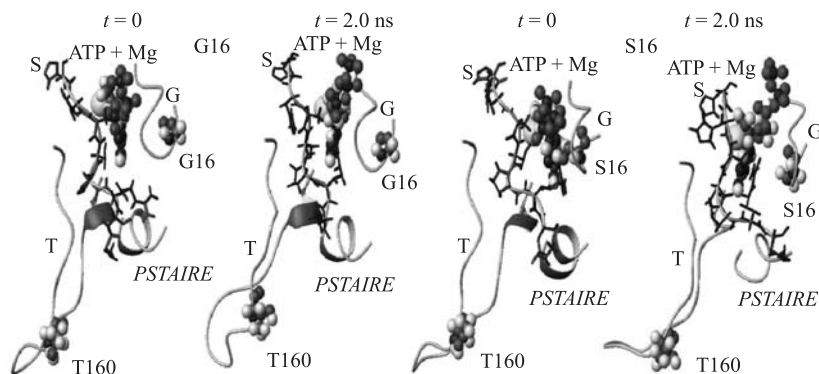


Рис. 6. Сравнение начальных ($t = 0$) и конечных ($t = 2$ нс) конформаций для «ключевых структурных элементов» нативного (G16) и мутантного (S16) комплексов CDK2. Указаны сайт мутационного замещения G/S16 и сайт фосфорилирования T160, комплексы АТФ- Mg^{2+} , фрагмент *PSTAIRE*, а также позиции G-, Т-петель и субстрата S

тантной (CDK2-S16) структуре значительно деформирована, а конформация Т-петли в структуре CDK2-S16 изогнута от циклина в направлении щели.

На рис. 7 приведены результаты анализа структурных перестроек по данным МД-расчетов для следующих частей белкового комплекса активной киназы CDK2: (1) киназа (ост. 1–296); (2) циклин (ост. 297–554); (3) суммарно киназа и циклин; (4) субстрат (ост. 557–563); (5) Т-петля (ост. 147–167) и (6) G-петля (ост. 11–18). Нумерация аминокислотных остатков соответствует положениям атомов в исходной PDB-структуре. Анализ значений среднеквадратичных смещений атомов RMSD (root-mean-square displacement) различных элементов комплекса показал, что по сравнению с исходной кристаллической решеткой у циклина и киназы в среднем происходит смещение на 1,8–1,6 Å. G-петля изменяет свое положение в среднем на 2 Å, Т-петля — на 1,4 Å, а

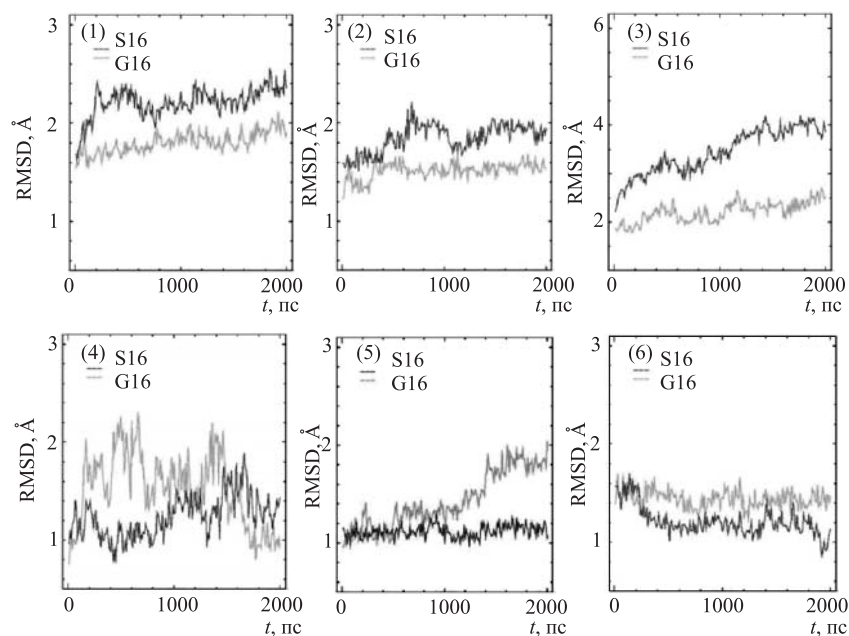


Рис. 7. Значения среднеквадратичных отклонений смещений атомов (RMSD) различных частей белкового комплекса активной киназы CDK2: (1) киназа (ост. 1–296); (2) циклин (ост. 297–554); (3) суммарно киназа и циклин; (4) субстрат (ост. 557–563); (5) Т-петля (ост. 147–167) и (6) G-петля (ост. 11–18)

фрагмент субстрата подвергается сильным конформационным флуктуациям. Внесение единичной замены G16S приводит к более сильному смещению атомов (рис. 7). При этом заметные конформационные изменения белкового комплекса CDK2-S16 наблюдаются не только в отдельных фрагментах, но и в структуре в целом. В среднем происходит дополнительное смещение на $0,4 \text{ \AA}$ у циклина и киназы по сравнению с равновесной структурой комплекса CDK2-G16.

Наиболее сильные смещения наблюдаются для G-петли, в которой локализована замена G16S, дополнительное смещение по сравнению с немутантным комплексом составляет порядка 1 \AA . G-петля локализована в N-конце киназы. По литературным данным известно, что N-концевой кулак функционально важен и консервативен для всех киназ, например, cAPK, CDK2 (De Bondt et al., 1993), MAP-киназы ERK2 и twitchin-киназы. N-концевой кулак участвует в связывании АТФ атомами главной цепи, а также содержит регуляторный сайт фосфорилирования T15, закрытый T-петлей в неактивной форме киназы (De Bondt et al., 1993). Поэтому мы более подробно рассмотрели изменения в каталитической щели, сформированной N-концом,

T-петлей, АТФ и субстратом. Из рис. 8 видно, что аминокислотный остаток S16 располагается ближе к комплексу АТФ- Mg^{2+} по сравнению с нативной структурой G16. В области N-конца две β -нити, огибающие концы G-петли, в мутантной структуре имеют более упорядоченную параллельную ориентацию. Замена G16S вызывает значительную деформацию G-петли, она удлиняет ее на 2,5 Å (рис. 9).

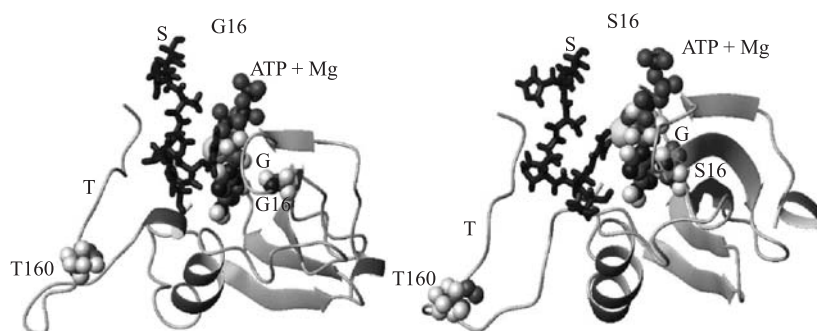


Рис. 8. Расположение белковых фрагментов в зоне «активационного центра» нативного (G16) и мутантного (S16) комплексов CDK2. Показаны результирующие равно-весные конформации для 2-нс состояния

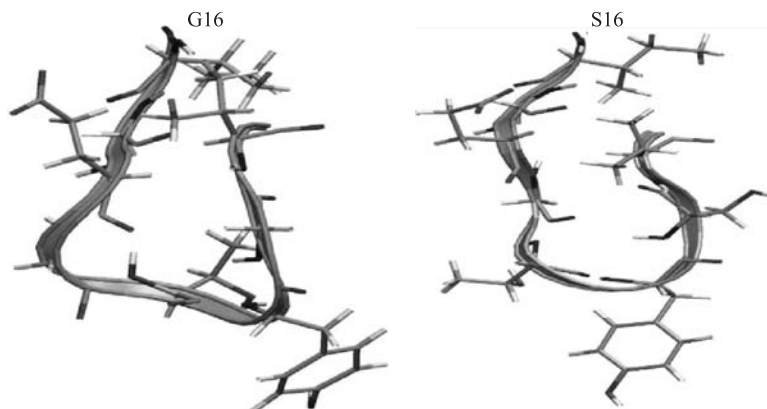


Рис. 9. Сравнение конформации G-петли в конечном состоянии (2 нс) для нативного (G16) и мутантного (S16) комплексов CDK2

Сайт связывания АТФ локализован в щели между кулачками (De Bondt et al., 1993). Анализ бинарного неактивного комплекса CDK2/АТФ показал, что три существенные петли (G-петля, каталитическая и D-F-G-петля (Asp184 Phe Gly)) собираются вместе в активном сайте и осуществляют правильное расположение фосфатов, удобное для передачи γ -фосфата АТФ белковому субстрату. Нуклеотид зафиксирован в гидрофобном кармане между

β -листом малого кулака и петель большого кулака, образованной $\beta 5$ и $\alpha 2$, и удерживается ионными и водородными связями с несколькими остатками, включая Lys33, Asp145, и опорными амидами G-петли между $\beta 1$ и $\beta 2$. Кислород O_2 рибозы и кислород O_{1A} первого фосфата АТФ (рис. 2) участвуют в октаэдральной ориентации иона Mg^{2+} . Три других лиганда, участвующих в координации Mg^{2+} , это два инвариантных остатка из большого кулака Asp145, Asn132 и молекула воды. Таким образом, каталитические сайты (Lys33, Asn132, Asp145) участвуют в ориентации фосфатов АТФ и координации Mg^{2+} и являются критическими для катализа (Jeffrey et al., 1995).

На рис. 10–13 приведены результаты, которые иллюстрируют молекулярную динамику пространственной ориентации молекулы АТФ по отношению к

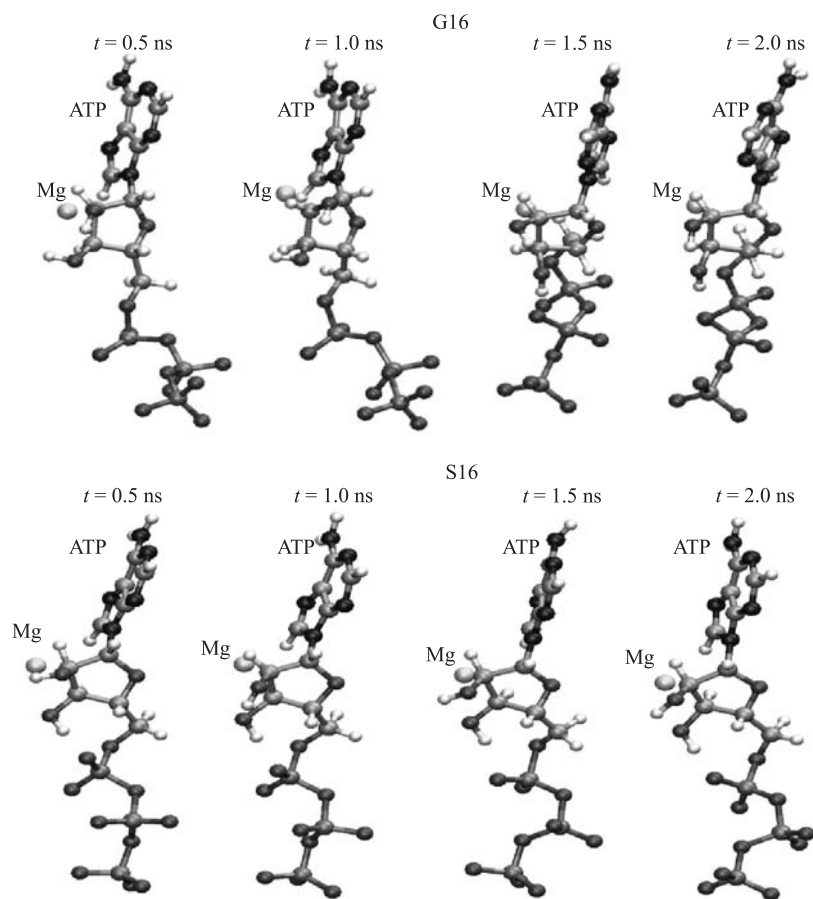


Рис. 10. Динамика пространственных ориентаций молекулы АТФ по отношению к иону магния для нативного (G16 — верхний «снимок») и мутантного (S16 — нижний «снимок») комплексов

иону магния для нативного (G16) и мутантного (S16) комплексов. Из рис. 10–13 следует, что конформация АТФ, стартовав из одинаковых исходных конфигураций, тем не менее в вариантах G16 и S16 будет существенно отличаться друг от друга, а именно: в нативной G16-структуре молекула АТФ будет располагаться более близко к иону магния (АТФ как бы прижимается к магнию), вследствие чего группа C5 рибозы (сайт, локализованный между рибозой и P α -АТФ на рис. 11) и аденин будут повернуты в сторону иона магния. В

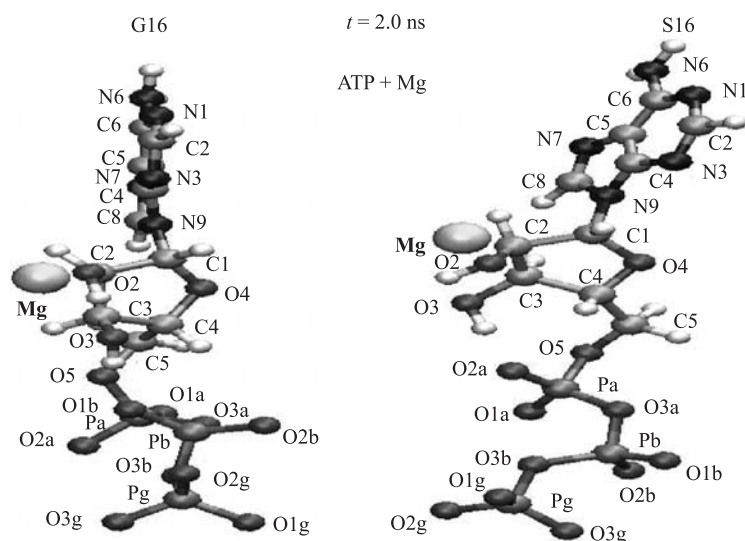


Рис. 11. Пространственные ориентации молекулы АТФ по отношению к иону магния в конечном состоянии (2 нс) для нативного (G16) и мутантного (S16) комплексов

мутантной же S16-структуре эти вышеотмеченные изменения не происходят, вследствие действия мутации в структуре белка АТФ «теряет или ослабляет способность» взаимодействовать с Mg²⁺. Следует отметить, что полученные структуры комплекса АТФ+Mg²⁺ являются достаточно равновесными (для сравнения 4-конечных консервативных состояний см. рис. 12). На рис. 13 показана динамика изменения углов между атомами C4-C5-O5 (а) и Pa-Pb-Pg (б) в молекуле АТФ для нативного (G16) и мутантного (S16) комплексов соответственно.

Анализ структуры активной киназы показал, что в октаэдральной ориентации иона Mg²⁺ участвуют кислород O₁ рибозы и кислород O_{1A} P α -АТФ (рис. 14). Три других лиганда, участвующих в координации Mg²⁺, это два инвариантных остатка из большого кулака Asp145, Asn132.

На рис. 15 приведены отклонения расстояния между каталитическими остатками аминокислот, АТФ и субстратом. Видно, что мутация вносит существенные изменения в их относительную ориентацию. Расстояние между

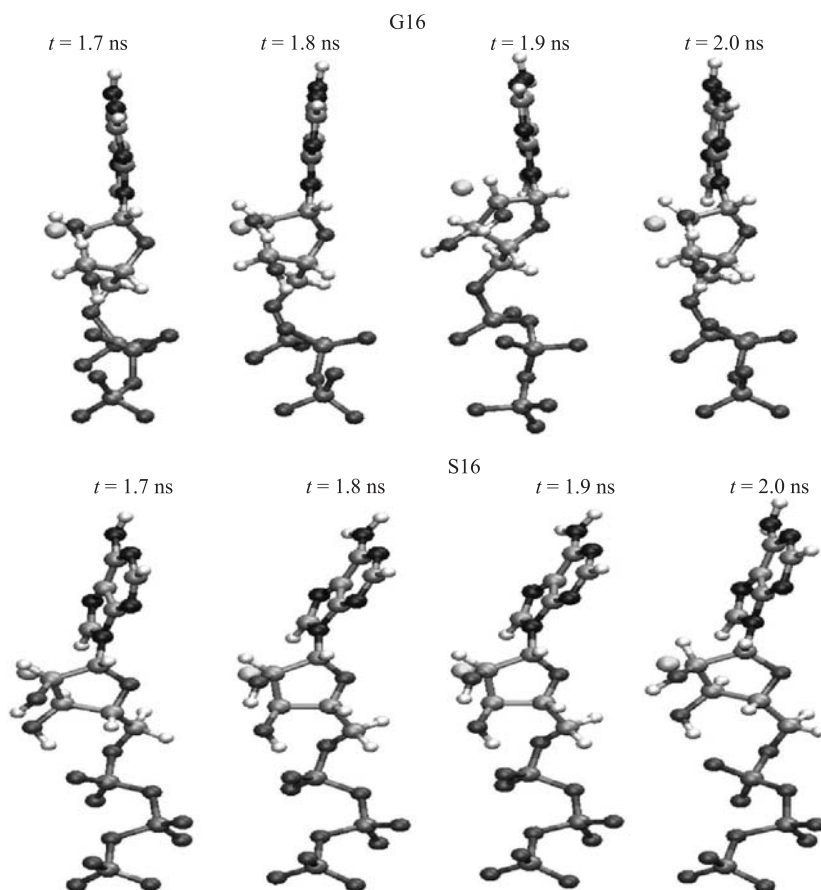


Рис. 12. Сравнение «fitting» результирующих пространственных конфигураций молекулы АТФ с ионом магния для нативного (G16 — верхний «снимок») и мутантного (S16 — нижний «снимок») комплексов

T160 ($O_{\gamma 1}$) и АТФ (O_4) увеличилось на 5 Å, а между S16 (атом N амидной группы серина) и T160 ($O_{\gamma 1}$) — на 3 Å.

Кроме того, сильно деформировалась поверхность узнавания циклином (спираль $\alpha 1$, L4 и T-петля).

Таким образом, замена глицина в G-петле сильно меняет ее ориентацию по отношению к комплексу АТФ- Mg^{2+} и другим частям белкового комплекса. У мутанта наблюдается изменение конформации АТФ и его положения, изменяются связи иона Mg^{2+} . В результате происходит деформация структуры всей киназной субъединицы, ориентации АТФ и циклина. Расстояние между фосфорилируемым Ser субстрата и γ -фосфатом АТФ увеличилось

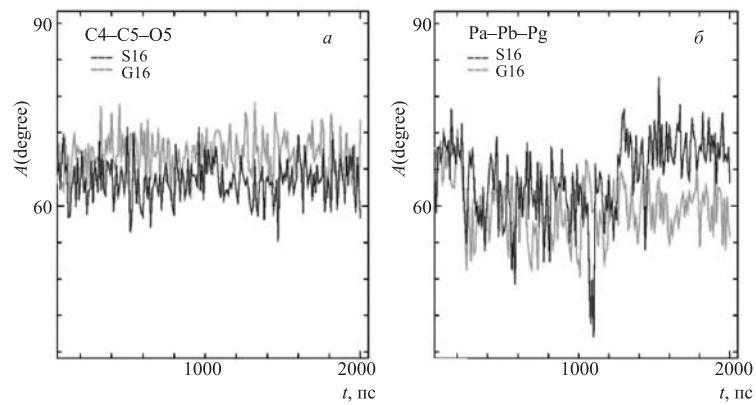


Рис. 13. Динамика изменения углов в молекуле АТФ между атомами C4-C5-O5 (а) и Pa-Pb-Pg (б) для нативного (G16) и мутантного (S16) комплексов

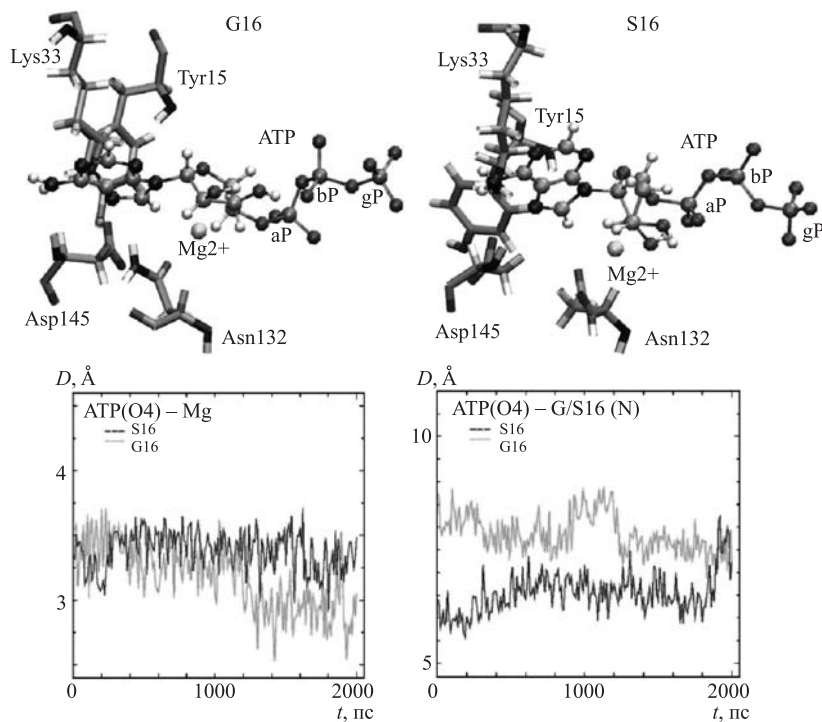


Рис. 14. Локализация сайта связывания АТФ (верхние «снимки») и диаграммы расстояния от АТФ до иона магния и точки мутации (нижние графики)

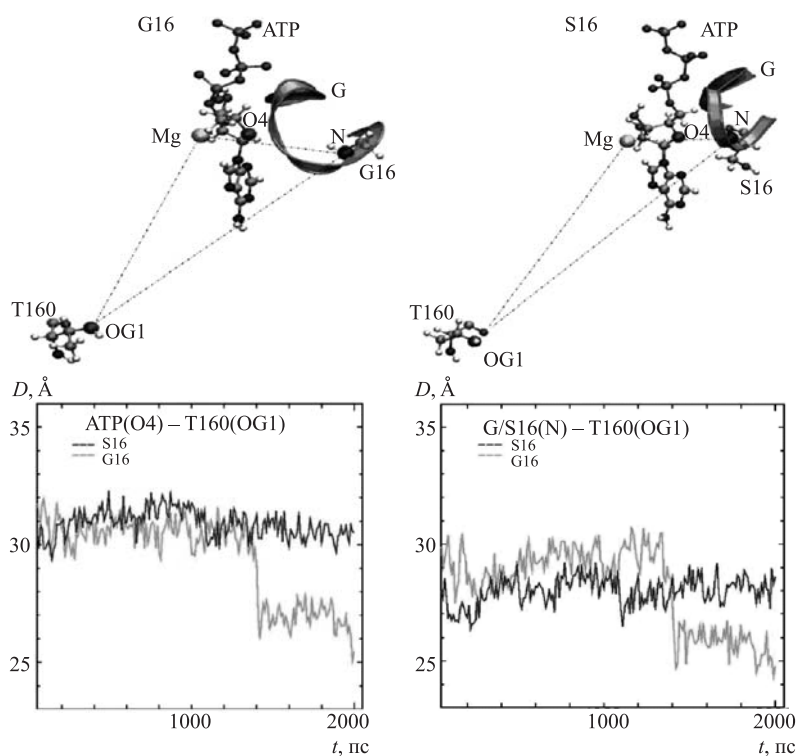


Рис. 15. Локализация сайта фосфорилирования T160 (верхние «снимоты») и диаграммы расстояния от T160 до АТФ и аминокислотного остатка 16 (нижние графики)

на 3 Å. Можно предположить, что замена G16S будет сказываться на киназной активности и это влияние обусловлено изменением относительного положения субстрата и γ -АТФ, приводящим к снижению способности фосфорилировать субстрат.

Эти изменения, по-видимому, приводят к различным последствиям, в частности, влияют на связывание с циклинами, субстратами, киназную активность и регуляторное фосфорилирование. Известно, что замена глицинов в G-петле, в частности первого и второго глицина (GxGxxG), на аланин или серин приводит к резкому снижению активности с АРК (Hemmer et al., 1997; Tsigelny et al., 1999; Aimes et al., 2000; Johnson et al., 2001). В настоящей работе продемонстрировано значение третьего консервативного глицина. Данные МД-моделирования имеют предсказательную силу и могут быть проверены экспериментально.

Настоящая работа была выполнена при поддержке компьютерных технических средств Лаборатории вычислительной астрофизики Института физи-

ческих и химических исследований (RIKEN, Япония). Авторы выражают глубокую признательность лаборатории за предоставленное компьютерное время для работы на суперкомпьютере и компьютере специального назначения MDGRAPE-2 для проведения расчетов молекулярной динамики белковых молекул и директору лаборатории профессору Toshikazu Ebisuzaki за поддержку программных лицензионных продуктов и компьютеров MDGRAPE-2 для расчетов протеинов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Devin A. B. et al.* The Start gene CDC28 and genetic stability of yeast // *Yeast*. 1990. V. 6. P. 231-243.
2. *Koltovaya N. A., Arman I. P., Devin A. B.* Mutations of the CDC28 gene and the radiation sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast*. 1998. V. 14. P. 133-146.
3. *Mendenhall M. D., Hodge A. E.* Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998. V. 62. P. 1191-1243.
4. *Koltovaya N. A., Kadyshevskaya K. Yu., Devin A. B.* DNA repair and cell cycle regulation: CDC28 gene and new mitotic checkpoint genes // *Yeast*. 1995. V. 11. P. 73.
5. *De Bondt H. L. et al.* Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2 // *Nature*. 1993. V. 363. P. 595-602.
6. *Jeffrey P. D. et al.* Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclin A – CDK2 complex // *Nature*. 1995. V. 373. P. 313-320.
7. *Green E. D., Olson M. V.* Systematic screening of yeast artificial-chromosome libraries by use of the polymerase chain reaction // *PNAS*. 1990. V. 87. P. 1213-1217.
8. *Pearlman D. A. et al.* AMBER, a computer program for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to elucidate the structures and energies of molecules // *Comp. Phys. Commun.* 1995. V. 91. P. 1-41.
9. *Case D. A. et al.* AMBER 8.0. University of California, 2003.
10. *Narumi T. et al.* // *B. Mol. Simul.* 1999. V. 21. P. 401-415;
Narumi T. et al. MDM version of AMBER, 2000.
11. *Okimoto N. et al.* Molecular dynamics simulations of prion proteins — effect of Ala117 ⇒ val. Mutation // *Chem-Bio Informatics J.* 2003. V. 3, No. 1. P. 1-11.
12. *Cornell W. D. et al.* A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids and organic molecules // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 5179-5197.

13. *Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D.* Comparison of simple potential functions for simulating liquid water // *J. Chem. Phys.* 1983. V. 79. P. 926–935.
14. *Berendsen H.J.C. et al.* Molecular dynamics with coupling to an external bath // *J. Chem. Phys.* 1984. V. 81. P. 3684–3690.
15. *Ryckaert J.P., Ciccotti G., Berendsen H.J.C.* Numerical-Integration of Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints — Molecular-Dynamics of N-Alkanes // *J. Comput. Phys.* 1997. V. 23. P. 327–341.
16. *Kholmurodov Kh.T. et al.* Methods of Molecular Dynamics for Simulations of the Physical and Biological Processes // *Phys. Part. Nucl.* 2003. V. 34, No. 2. P. 474–501.
17. *Kholmurodov Kh., Hirano Y., Ebisuzaki E.* MD Simulations on the Influence of Disease-Related Amino Acid Exchanges in the Human Prion Proteins // *Chem-Bio Informatics J.* 2003. V. 3, No. 2. P. 86–95.
18. *Kholmurodov Kh., Ebisuzaki T.* MD Simulation on the Structural Changes and Conformational Dynamics of the Retinal Proteins (Rhodopsins) in and Explicit Solvent // *ICMS-CSW2004.* 2004. V. C4. P. 9–11.
19. *Kholmurodov Kh.* Molecular-Dynamics Simulations of Rhodopsin and Prion Proteins: The Effect of Disease-Related Amino Acid Mutations on Their Structural Conformations // *Phys. Part. Nucl.* 2005. V. 36, No. 2. P. 291–318.
20. *Sayle R.A., Milner-White E.J.* RasMol: Biomolecular graphics for all // *Trends in Biochem. Sci.* 1995. V. 20. P. 374–376.
21. *Koradi R., Billeter M., Wuthrich K.* MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structure // *J. Mol. Graphics.* 1996. V. 4. P. 51–55.
22. *Winston F., Chumley F., Fink G.R.* Eviction and transplacement of mutant genes in yeast // *Enzymol.* 1993. V. 101. P. 211–228.
23. *Casanova J.L. et al.* Optimal conditions for directly sequencing double-stranded PCR products with sequenase // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 4028–4032.
24. *Hadwiger J.A. et al.* The *Saccharomyces cerevisiae* CKS1 gene, a homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* suc1+ gene, encodes a subunit of the CDC28 protein kinase complex // *Mol. Cell Biol.* 1989. V. 9. P. 2034–2041.
25. *Yu V. et al.* A kinase-independent function of Cks1 and Cdk1 in regulation of transcription // *Molecular Cell.* 2005. V. 17. P. 145–151.
26. *Hemmer W. et al.* Role of the glycine triad in the ATP-binding site of cAMP-dependent protein kinase // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 16946–16954.
27. *Tsigelny I. et al.* 600 ps molecular dynamics reveals stable substructures and flexible hinge points in cAMP dependent protein kinase // *Biopolymers.* 1999. V. 50. P. 513–524.

28. *Aimes R. T., Hemmer W., Taylor S.S.* Serine-53 at the tip of the glycine-rich loop of cAMP-dependent protein kinase: Role in catalysis, P-site specificity, and interaction with inhibitors // *Biochemistry*. 2000. V. 39. P. 8325–8332.
29. *Johnson D.A. et al.* Dynamics of cAMP-dependent protein kinase // *Chem. Rev.* 2001. V. 101. P. 2243–2270.

Получено 14 февраля 2006 г.

Редактор *Е. В. Сабеева*

Подписано в печать 12.05.2006.

Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 1,12. Уч.-изд. л. 1,39. Тираж 220 экз. Заказ № 55323.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.

E-mail: publish@pds.jinr.ru

www.jinr.ru/publish/