

P19-2006-90

Д. А. Кретов, Х. Т. Холмуродов, Н. А. Колтовая

**АНАЛИЗ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ АТФ  
И КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЕЙ  
КИНАЗЫ (НАТИВНОЙ И МУТАНТНОЙ)  
С ПОМОЩЬЮ МД-МОДЕЛИРОВАНИЯ  
КРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ РЕШЕТКИ  
АКТИВНОЙ КИНАЗЫ **CDK2****

Направлено в «Журнал физической химии»

Кретов Д. А., Холмуродов Х. Т., Колтовая Н. А. P19-2006-90  
Анализ связей между АТФ и каталитической субъединицей киназы  
(нативной и мутантной) с помощью МД-моделирования кристаллической  
решетки активной киназы CDK2

С помощью молекулярно-динамического (МД) моделирования проведен анализ изменений функционально значимых структурных элементов кристаллической решетки двух комплексов активной киназы pT160-CDK2/циклин А/АТФ-Mg<sup>2+</sup>/субстрат, нативного (CDK2-G16) и мутантного (CDK2-S16), в условиях физиологической температуры ( $T = 300$  К). Показано, что замена одной аминокислоты G16S в каталитической субъединице приводит к сильным изменениям структуры киназы. Эти изменения сказываются на структуре, ионных и водородных связях АТФ.

Работа выполнена в Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2006

Kretov D. A., Kholmurodov Kh. T., Koltovaya N. A. P19-2006-90  
Analysis of the Bonds between the ATP and Catalytic Subunit of Kinases  
(Wild and Mutant) Using MD Simulations of the Active CDK2 Crystal Lattice

Based on the MD simulations the analysis of conformational behavior of the crystal lattice of two-component active kinase pT160-CDK2/cyclin A/ATP-Mg<sup>2+</sup>/substrate of the native (CDK2-G16) and mutant (CDK2-S16) proteins at the physiological temperatures ( $T = 300$  K) is performed. It is shown that a single G16S substitution in kinase catalytic subunit leads to significant changes of the total kinase structure. These changes influence the ATP structure, ionic and hydrogen bonds.

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

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

## ВВЕДЕНИЕ

Циклинзависимые киназы CDK (cyclin dependent kinase) играют центральную роль в регуляции клеточного цикла [1]. Изучение структуры и функциональной значимости отдельных структурных элементов киназы представляет практический интерес в связи с наблюдаемой высокой частотой нарушения CDK или дерегуляции ингибиторов CDK при злокачественном перерождении клеток. У дрожжей киназа CDK1/CDC28 относится к жизненно важным ферментам и полное разрушение гена летально для клетки. Поэтому для изучения функциональной значимости гена и значения определенных элементов структуры киназы для ее функционирования, как правило, используют температурочувствительные мутации, при перmissive температуре совместимые с жизнеспособностью клеток, а при рестриктивной температуре блокирующие цикл деления на определенной стадии. При этом различные мутации, частично нарушающие функции киназы, лишь частично выявляют спектр функциональной значимости киназы.

Каталитическая субъединица киназы эволюционно консервативна и имеет схожую структуру для человека и дрожжей [2]. Одним из структурных элементов является G-богатая петля GxGxxG в N-концевом участке. У дрожжей мутация *cdc28-srm* [G20S] [3], представляющая собой замену одного из консервативных глицинов на серин в G-петле, имеет широкое плеiotропное проявление. Эта мутация вызывает изменения клеточного цикла, снижение генетической стабильности, повышение радиочувствительности и влияет на checkpoint-контроль [4–6], причем при физиологических температурах, что позволяет изучать участие киназы в многочисленных клеточных процессах. Функциональная важность G-петли показана также для киназы человека цАПК, замена первого (G11) и второго (G13) глицинов на аланин и серин приводила к сильному снижению активности киназы [7–10]. Кроме того, в G-петле локализованы сайты негативной регуляции; фосфорилирование остатков T14 и Y15 приводит к инактивации киназы CDK2 [1]. Однако роль G-петли в архитектуре белка мало изучена. С помощью МД-моделирования нами проведен анализ структурных изменений киназы, вызванных заменой третьего глицина в G-петле. Особое внимание уделяется структурным изменениям АТФ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ МД-МОДЕЛИРОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Киназы CDK относятся к семейству серин-треониновых протеинкиназ. Фермент осуществляет каталитическую передачу  $\gamma$ -фосфата АТФ на серин

или треонин в *S/T – P*-мотиве белковых субстратов. Структура киназ консервативна и наблюдается высокая гомология первичной последовательности для киназы человека и дрожжей (~62 %) [11, 12]. Для моделирования структурных изменений дрожжевой киназы CDC28, вызванных заменой третьего консервативного глицина (G16S), использовали кристаллическую решетку киназы человека CDK2 из базы данных PDB (файл 1QMZ). В активный комплекс протеинкиназы pT160-CDK2/циклин A/АТФ-Mg<sup>2+</sup> входят фосфорилированная киназная субъединица pT160-CDK2, фрагмент циклина (ост. 173–432), пентамер субстрата (HNASPRK), содержащий в центральной области сайт фосфорилирования, и активный АТФ, связанный с ионом Mg<sup>2+</sup> (рис. 1). Комплекс окружен 2287 молекулами воды. Поскольку глицин G20-CDC28 дрожжевой киназы соответствует глицину G16-CDK2 киназы человека, то в исходной кристаллической решетке CDK2 осуществили замещение G16 на

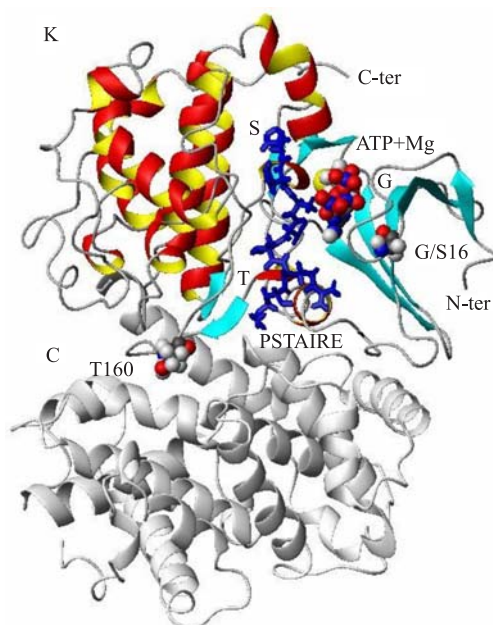


Рис. 1. Структура киназы человека CDK2 (файл 1QMZ из базы данных PDB). Белковый комплекс состоит из киназы (К) и циклина А (С). Каталитическая субъединица киназы упакована в два кулака: N и S. Выделены структурные элементы киназы: N — N-кулак (ост. 1-85), С — С-кулак (ост. 86-298), G — G-петля (ост. 11-18), Т — Т-петля (ост. 147-167), PSTAIRE (ост. 45-51), S — субстрат (HNASPRK), АТФ+Mg — комплекс АТФ с ионом магния Mg<sup>2+</sup>. Также сферическими атомами изображены аминокислотные остатки Т160, сайт фосфорилирования в Т-петле, и сайт мутационного замещения глицина на серин

S16 и провели МД-моделирование для обоих комплексов, нативного CDK2-G16 и мутантного CDK2-S16.

*Изменения структуры каталитической субъединицы.* Ранее был проведен анализ неактивной киназы (без циклина и субстрата) и показано, что внесение мутации G16S в кристаллическую решетку каталитической субъединицы киназы CDK2 вызывает существенное изменение структуры [3], так, увеличилась каталитическая щель между двумя кулачками киназы, расстояние между T160, локализованным в Т-петле большого кулака, и мутантным остатком в G-петле малого кулака увеличилось с 12,33 до 17,57 Å.

В данной работе мы провели анализ активной киназы, т. е. фосфорилированной каталитической субъединицы в комплексе с циклином и субстратом. Равновесные положения атомов для каждого из комплексов CDK2-G16 и CDK2-S16 рассчитывали с шагом 1 фс на протяжении 2 нс. За это время комплексы достигли равновесного состояния. На рис.2 представлены ко-

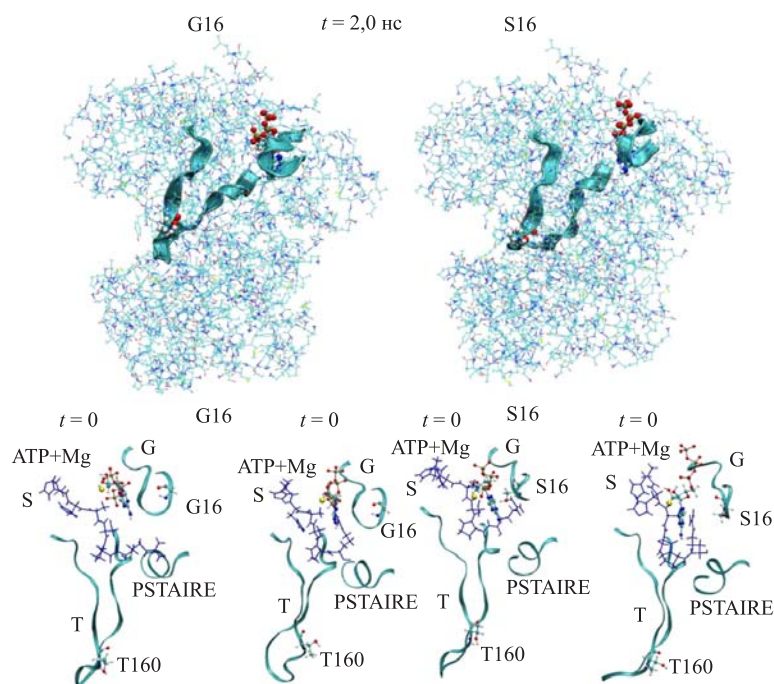


Рис. 2. Конечные структурные конформации по данным молекулярно-динамических расчетов нативного (G16) и мутантного (S16) комплексов CDK2. Конформации белковых структур построены на основе расчета равновесных положений атомов комплексов CDK2 в интервале времени 2 нс. Выделены G, T и PSTAIRE петли, а также субстрат и АТФ

нечные 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 различаются и приводят к различающимся равновесным структурам.

Взаимодействие трех «ключевых» аминокислотных остатков каталитической щели Lys33, Asn132 и Asp145 проиллюстрировано диаграммами (рис. 3). Расстояние между сайтами Asp145 и Asn132 не изменяется заметным образом, и, по-видимому, они не меняют своего взаимного расположения. Однако Lys33 в мутантной структуре расположен заметно дальше от Asn132, как и от Asp145 (рис. 3).

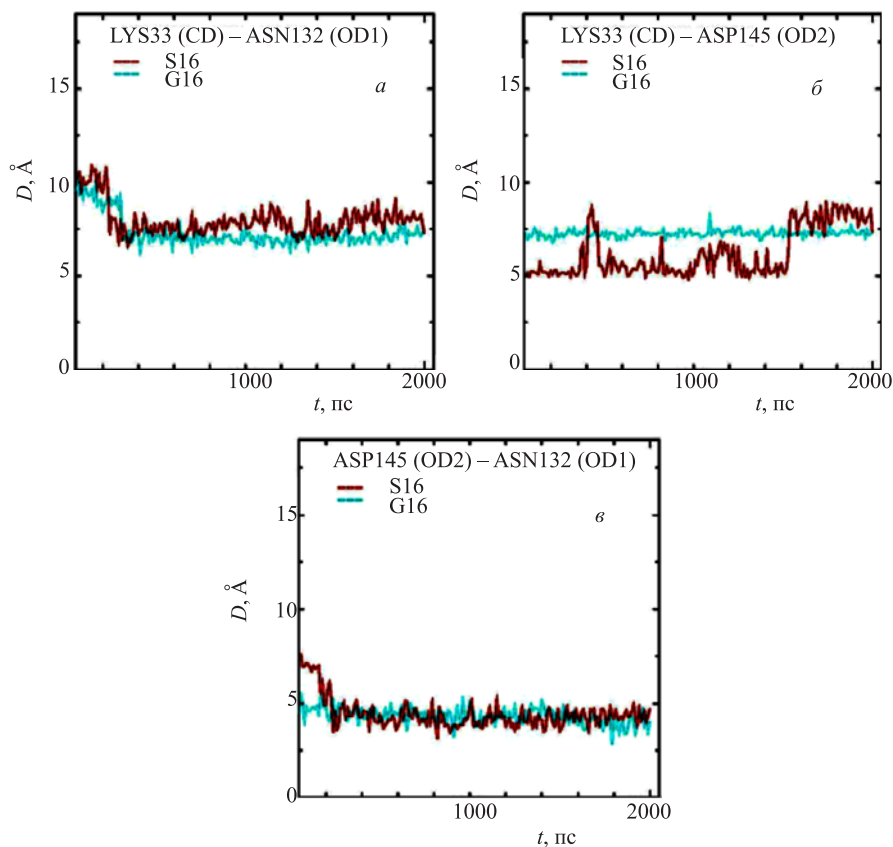


Рис. 3. Диаграммы расстояний в области активного центра для каталитических сайтов Asp145, Asn132 и Lys33

Изменение структуры киназной субъединицы вызывает изменение связей с АТФ и самой структуры АТФ.

*Изменение структуры АТФ.* Анализ изменений дигедрального угла C8-N9-C1-C2 между аденином и рибозой АТФ показал, что по сравнению с кристаллической решеткой угол изменяется на ранних стадиях МД-моделирования активной киназы. Для нативной структуры он составляет  $14,9^\circ$ , для мутантной —  $53,6^\circ$ . Также изменился угол, образованный фосфатами. На рис. 4 приведена зависимость изменения угла Pa-Pb-Pg ( $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -фосфатные группы) со временем для мутантной и нативной структур.

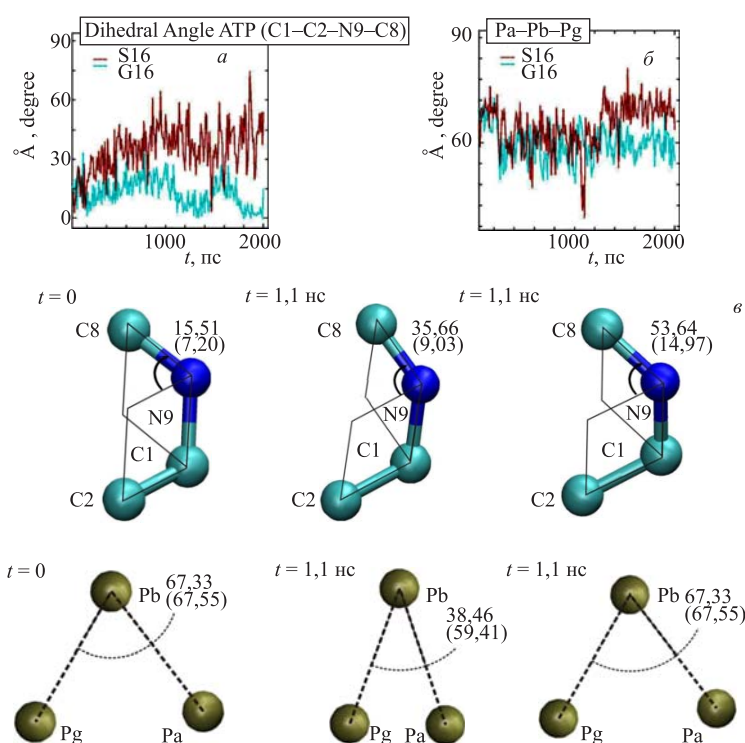


Рис. 4. Дигедральный (двугранный) угол C1C2-N9C8 и пространственный угол Pa-Pb-Pg между фосфатными группами в молекуле АТФ. Результирующие углы указаны для мутантной структуры в градусах (для нативной структуры результаты указаны в скобках)

*Изменение связей АТФ.* Изменение структуры АТФ отражает факт изменения структуры киназной субъединицы, приведшего к изменению связей с АТФ. Сайт связывания АТФ локализован в щели между кулачками киназы [2]. Локализация АТФ в киназном комплексе изучена при рентгеноструктурном

анализе кристаллической решетки неактивной киназы CDK2 [2]. Показано, что в неактивном бинарном комплексе CDK2-Mg<sup>2+</sup>-АТФ аденин располагается в гидрофобном кармане между  $\beta$ -листом малого кулачка и петлей L7 между  $\beta 5$  и  $\alpha 2$ . АТФ удерживается на месте ионными и водородными взаимодействиями между несколькими остатками, включая Lys33, Asp145 и боковые амиды G-петли между  $\beta 1$  и  $\beta 2$ . В активном комплексе киназы CDK2 связывание киназы с циклином и фосфорилирование T160 приводит к тому, что АТФ ориентируется более удобно для передачи фосфатной группы субстрату [13].

Анализ межатомных расстояний в области активного центра для АТФ и каталитических сайтов Asp145, Asn132 и Lys33, участвующих в ориентации фосфатов АТФ, приведен на рис. 5 и 6. Как видно из рисунков, аминокислотный остаток Asp145 расположен к молекуле АТФ заметно ближе в нативном

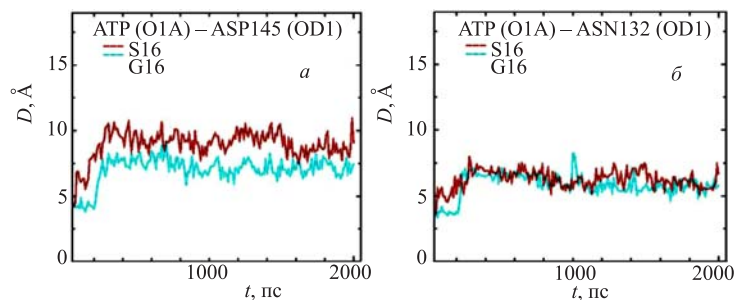


Рис. 5. Локализация АТФ, диаграммы расстояния от АТФ (атом O1A) до Asp145 (атом OD1) и от АТФ (атом O1A) до Asn132 (атом OD1)

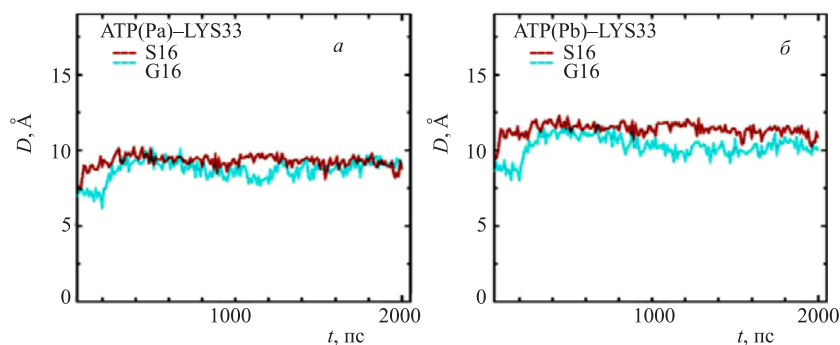


Рис. 6. Локализация АТФ, диаграммы расстояния от АТФ (атом PA) и АТФ (атом PB) до Lys33



варианте, чем в мутантном варианте, как и остаток Lys33 по отношению к АТФ (Pa и Pb). Что касается Asn132, то введение мутационного замещения G16S не влияет существенным образом на расстояние между АТФ и Asn132. Сайт Asn132 в обеих белковых структурах CDK2-G16 и CDK2-S16 имеет одинаковую динамику поведения и, скорее всего, не меняет свое пространственное расположение по отношению к молекуле АТФ.

В большей части ферментативных реакций, в которых АТФ играет роль донора фосфатов, участвует активная форма АТФ, а именно комплекс  $Mg^{2+}$ -АТФ. Ион магния  $Mg^{2+}$  выступает в качестве стабилизатора белковых структур, а также инициирует превращение нуклеозидтрифосфатов в нуклеозидмонофосфат по радикальному механизму [14]. В водном растворе при связывании с АТФ ион магния формирует вокруг себя октаэдрическую конфигурацию.  $Mg^{2+}$  хелатирует два атома кислорода O2 и O3 рибозы, а две оставшиеся связи — с молекулами воды.

В неактивной киназе в октаэдрическую конформацию иона  $Mg^{2+}$  вносит вклад кислород от каждой из трех фосфатных групп АТФ [2]. Три других лиганда, участвующих в ориентации  $Mg^{2+}$ , — это Asp145, Asn132 и молекула воды. По данным [13] в активной киназе с ионом  $Mg^{2+}$  взаимодействуют атомы кислорода АТФ (O $\alpha$ 1), Asn132 (O $\delta$ 1), Asp145 (O $\delta$ 2) и три молекулы воды.

Мы рассмотрели структуру АТФ- $Mg^{2+}$  в комплексе активной киназы. Как видно из рис. 7–9, в ориентации иона  $Mg^{2+}$  участвуют атомы кислорода O2 рибозы и O1A P $\alpha$ -АТР. Два других лиганда, участвующих в координации  $Mg^{2+}$ , это два инвариантных остатка из большого кулака Asp145 и Asn132.

На рис. 7 и 8 приведены результаты, иллюстрирующие молекулярную динамику пространственной ориентации молекулы АТФ по отношению к иону магния  $Mg^{2+}$  для нативного (G16) и мутантного (S16) комплексов. Из этих рисунков следует, что конформация АТФ, стартовав из одинаковых исходных конфигураций, тем не менее, в вариантах G16 и S16 существенно различается.

В нативной G16-структуре ион  $Mg^{2+}$  располагается ближе к молекуле АТФ, вследствие чего группа C5 рибозы (сайт, локализованный между рибозой и P $\alpha$ -АТР на рис. 7) и аденин повернуты в сторону  $Mg^{2+}$ . Из рис. 10 видно, что равновесное расстояние между ионом  $Mg^{2+}$  и молекулой АТФ (O4) в нативной структуре составляет порядка 2,5 Å, в то время как в мутантной структуре более 3,5 Å. По-видимому, в активном центре белкового комплекса в результате действия мутационного замещения аминокислоты в структуре протеинкиназы происходят перестройки водородных связей. Водородная связь, как правило, считается эффективной, если расстояние между атомами водорода, протоном донора и протоном акцептора меньше или порядка 2,6–2,4 Å. В мутантной структуре S16, по-видимому, O4-АТФ не участвует в ориентации иона  $Mg^{2+}$ . Следует отметить, что полученные структуры комплекса АТФ- $Mg^{2+}$  являются равновесными.

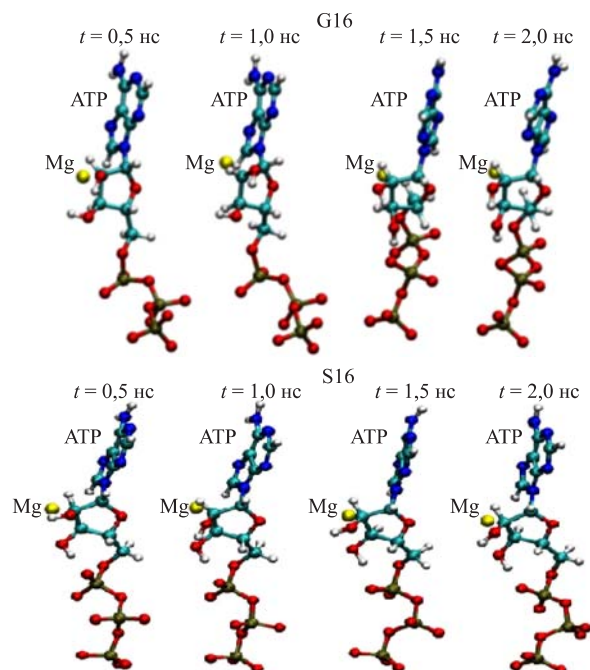


Рис. 7. Динамика пространственной ориентации молекулы АТФ по отношению к иону магния для нативного (G16 — верхний снимок) и мутантного (S16 — нижний снимок) комплексов

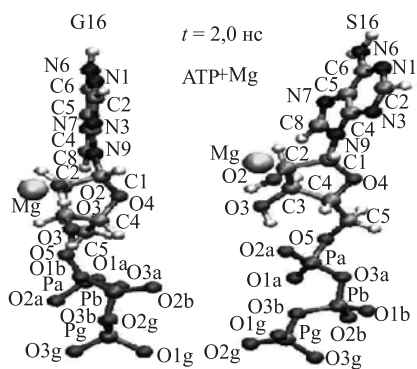


Рис. 8. Пространственная ориентация молекулы АТФ по отношению к иону магния в конечном состоянии (2 нс) для нативного (G16) и мутантного (S16) комплексов

В ориентации иона  $Mg^{2+}$  принимают участие также молекулы воды. По данным [13] с ионом  $Mg^{2+}$  взаимодействуют помимо атомов кислорода АТФ

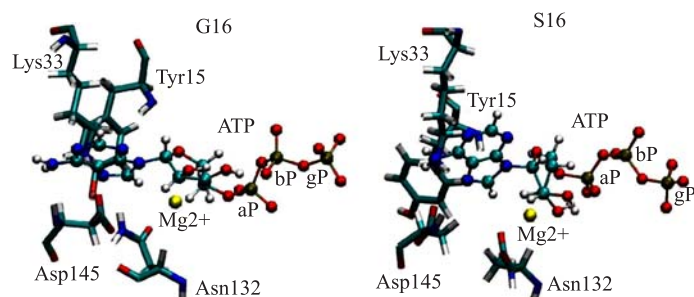


Рис. 9. Локализация АТФ и позиции каталитических сайтов (Asp145, Asn132), участвующих в ориентации фосфатов АТФ и координации  $Mg^{2+}$

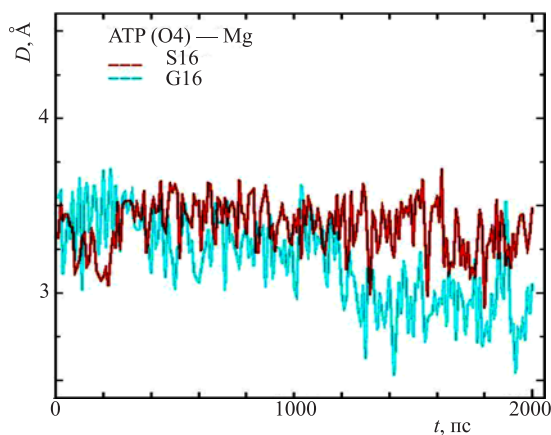


Рис. 10. Локализация сайта связывания АТФ, диаграмма расстояния между АТФ и ионом  $Mg^{2+}$

( $O\alpha 1$ ), Asn132 ( $O\delta 1$ ), Asp145 ( $O\delta 2$ ) еще три молекулы воды. Мы также оценили возможные взаимодействия комплекса АТФ- $Mg^{2+}$  с водным окружением. На рис. 11 представлены результаты расчетов позиций близлежащих к комплексу АТФ- $Mg^{2+}$  молекул воды на расстоянии 3–4 Å от катиона: нативная (а), мутантная (б) структуры.

По-видимому, изменение ориентации группы С5 рибозы и увеличение каталитической щели в мутантной структуре (см. рис.11, б) способствует большему проникновению молекул воды в каталитическую щель по сравнению с нативной. В области локализации катиона  $Mg^{2+}$  число молекул воды в мутантной структуре приблизительно вдвое больше, нежели в нативной.

Пространственное расположение молекулы АТФ с противоположной по отношению к иону  $Mg^{2+}$  стороны хорошо коррелирует с изменением ее ори-

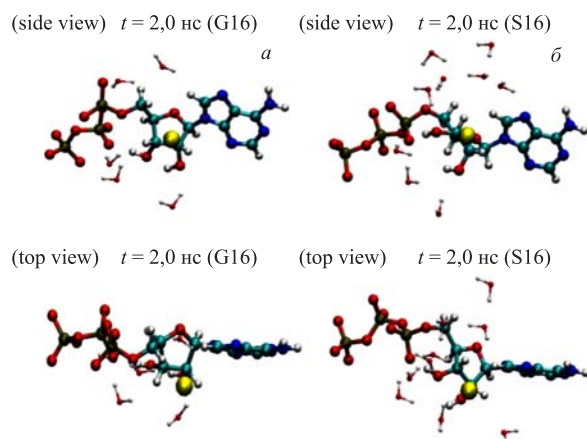


Рис. 11. Структурные молекулы АТФ + катион  $Mg^{2+}$  в присутствии окружающих молекул воды для нативной (G16) и мутантной (S16) структур белков протеинкиназы

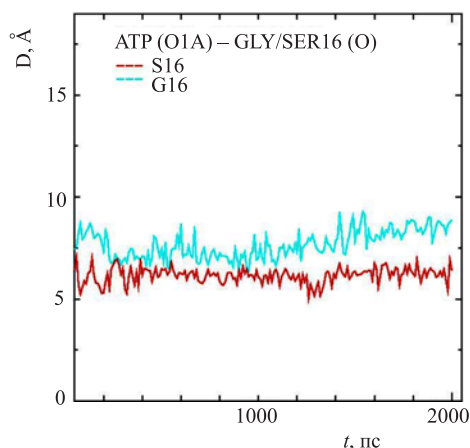


Рис. 12. Локализация сайта связывания АТФ, диаграмма расстояния от АТФ до точки мутации G/S16

ентации (рис. 7–8). Как видно из рис. 12, молекула АТФ более близко располагается к сайту мутационного замещения S16, нежели в нативной структуре G16-CDK2 (6,43 Å и 8,89 Å, соответственно). Отметим, что в неактивной киназе G16 располагается еще ближе, расстояние между АТФ (O1A) и G16(O) составляет 3 Å, а в мутантной – 7,5 Å.

Эти данные свидетельствуют о том, что в результате мутационной замены происходят значительные структурные перестройки в белковом комплексе CDK2, а именно в его активном центре. Молекула АТФ смещается в сторону

G-петли, и в мутантной структуре увеличивается расстояние между АТФ и ионом  $Mg^{2+}$  по сравнению с нативной структурой. Расстояния, вычисленные для конечного 2-нс состояния, в области активного центра белковых комплексов протеинкиназы суммированы на рис. 13. Данные наглядно демонстрируют конформационные изменения в структуре протеинкиназы человека, индуцированные единичной мутационной заменой аминокислоты в G-петле.

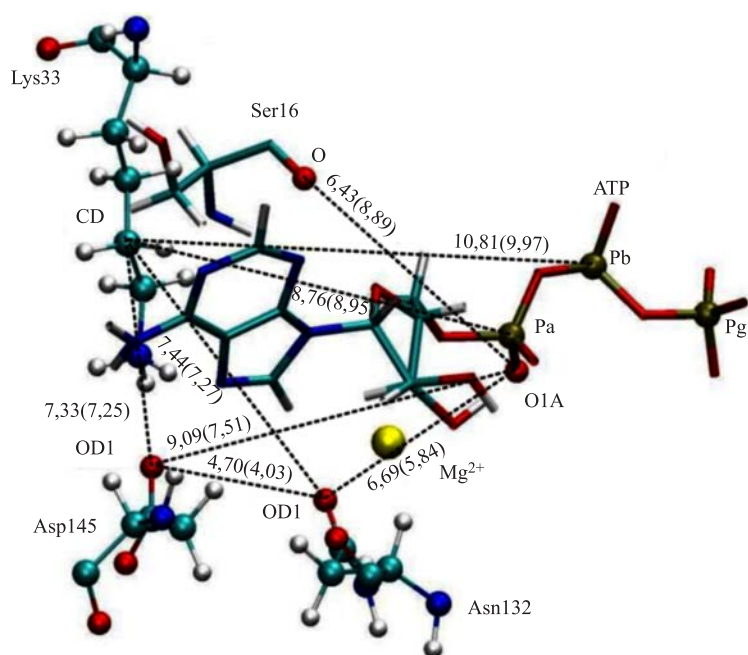


Рис. 13. Диаграмма расстояний в области активного центра протеинкиназы с комплексом АТФ– $Mg^{2+}$  для каталитических сайтов Asp146, Asn133, Lys33 и точки мутационного замещения Gly/Ser16. Результирующие расстояния из вышеприведенных диаграмм указаны для мутантной структуры в ангстремах (для нативной структуры результаты указаны в скобках)

Таким образом, замена глицина в G-петле сильно изменяет конформацию и ориентацию АТФ, изменяются связи иона  $Mg^{2+}$ . Результаты МД-моделирования позволяют предположить, что замена консервативного глицина в G-петле G16S будет сказываться на киназной активности, передаче  $\gamma$ -АТФ субстрату и это влияние обусловлено изменением относительного положения субстрата и  $\gamma$ -АТФ, приводящим к снижению способности фосфорилировать субстрат.

Для МД-моделирования использовали модуль SANDER программного пакета AMBER для специализированного компьютера MDGRAPE-2 [15–17].

Настоящая работа была выполнена при поддержке компьютерными техническими средствами Лаборатории вычислительной астрофизики Института физических и химических исследований, РИКЕН, Япония. Авторы выражают глубокую признательность директору Лаборатории, профессору Toshikazu Ebisuzaki за поддержку программных лицензионных продуктов и специализированных компьютеров MDGRAPE-2 для моделирования протеинов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. De Bondt H. L., Rosenblah J., Jancarik J., Jones H. D., Morgan D. O., Kim S.-H. Crystal Structure of Cyclin-Dependent Kinase 2 // *Nature*. 1993. V. 363. P. 595–602.
3. Koltovaya N. A., Kretov D. A., Kholmurodov Kh. T. Sequencing Analysis of Mutant Allele *cdc28-srm* of Protein Kinase *CDC28* and Molecular Dynamics Study of Glycine-Rich Loop in Wild Type and Mutant Allele *G16S* of *CDK2* as Model. *Molecular Simulation Studies in Materials and Biological Sciences*. Nova Science Publishers, 2005.
4. 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.
5. Devin A. B., Prosvirova T., Peshkxonov V. T., Chepurnaya O. V., Smirnova M. E., Koltovaya N. A., et al. The Start Gene *CDC28* and Genetic Stability of Yeast // *Yeast*. 1990. V. 6. P. 231–243.
6. 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.
7. Hemmer W., McGlone M., Tsigelny I., Taylor S. S. Role of the Glycine Triad in the ATP-Binding Site of cAMP-Dependent Protein Kinase // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 16946–16954.
8. Tsigelny I., Greenberg J. P., Cox S., Nichols W. L., Taylor S. S., Ten Eyck L. F. 600 ps Molecular Dynamics Reveals Stable Substructures and Flexible Hinge Points in cAMP Dependent Protein Kinase // *Biopolymers*. 1999. V. 50. P. 513–524.
9. 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.
10. Johnson D. A., Akamine P., Radzio-Andzelm E., Madhusudan N., Taylor S. S. Dynamics of cAMP-Dependent Protein Kinase // *Chem. Rev.* 2001. V. 101. P. 2243–2270.

11. *Lorincz A. T., Reed S. I.* Primary Structure Homology Between the Product of Yeast Cell Division Control Gene CDC28 and Vertebrate Oncogenes // *Nature*. 1984. V. 307. P. 183–185.
12. *Bartova I., Otyepka M., Kriz Z., Koca J.* Activation and Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase-2 by Phosphorilation; a Molecular Dynamics Study Reveals the Functional Importance of the Glycine-Rich Loop // *Protein Science*. 2004. V. 13. P. 1449–1457.
13. *Тулуб А. А.* Катион  $Mg^{2+}$  инициирует превращение нуклеозидтрифосфата в нуклеозидмонофосфат по радикальному механизму. Расчеты методом квантовой молекулярной динамики // *Биофизика*. 2006. Т. 51. вып. 2. С. 197–203.
14. *Case D. A., Pearlman D. A., Caldwell J. W., Cheatham III T. E., Ross W. S., Simmerling C. L., Darden T. A., Merz K. M., Stanton R. V., Cheng A. L., Vincent J. J., Crowley M., Ferguson D. M., Radmer R. J., Seibel G. L., Singh U. C., Weiner P. K., Kollman P. A.* AMBER 8.0. University of California, 2003.
15. *Narumi T., Susukita R., Ebisuzaki T., McNiven G., Elmergreen B.* // *Mol. Simul.* 1999. V. 21. P. 401–415.
16. *Okimoto N., Yamanaka K., Suenaga A., Hirano Y., Futatsugi N., Narumi T., Yasuoka K., Susukita R., Koishi T., Furusawa H., Kawai A., Hata M., Hoshino T., Ebisuzaki T.* Molecular Dynamics Simulations of Prion Proteins — Effect of Ala117  $\Rightarrow$  val. Mutation // *Chem-Bio Informatics J.* 2003. V. 3, No. 1. P. 1–11.

Получено 16 июня 2006 г.

Редактор *М. И. Зарубина*

Подписано в печать 04.10.2006.

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

Усл. печ. л. 0,81. Уч.-изд. л. 0,99. Тираж 220 экз. Заказ № 55494.

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

E-mail: [publish@jinr.ru](mailto:publish@jinr.ru)

[www.jinr.ru/publish/](http://www.jinr.ru/publish/)