

УДК 577.34 : 575.852 : 57.082.14

К.Е. Медведев¹, Д.А. Афонников^{1,2}, Ю.Н. Воробьев^{2,3}

¹*Институт цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск)*

²*Новосибирский государственный университет (г. Новосибирск)*

³*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
(г. Новосибирск)*

Работа выполнена при поддержке интеграционных проектов СО РАН №109, 26, 119, НОЦ НГУ (REC-008), Министерства образования и науки РФ (ГК № П857 и 07.514.11.4003) и программ РАН А.П.6 «Молекулярная и клеточная биология», 24 «Происхождение и эволюция биосферы» и РФФИ (грант № 11-04-01771-а).

ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ СТРУКТУР БЕЛКОВ Nip7 ГЛУБОКОВОДНЫХ И МЕЛКОВОДНЫХ АРХЕЙ В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОГО ДАВЛЕНИЯ

Исследовано влияние высокого давления на структурные характеристики РНК-связывающего белка Nip7 глубоководных и мелководных архей рода Pyrococcus методами моделирования молекулярной динамики и компьютерного анализа. Исследована доступность остатков растворителю и значение средне-квадратичного отклонения C-α атомов (RMSD) при разных значениях давления. Полученные данные свидетельствуют о том, что РНК-связывающий домен белка Nip7 более устойчив к влияниям высокого давления у глубоководного вида. Кроме того, анализ компьютерных моделей белков Nip7 из P. abyssi и P. furiosus показал, что с увеличением давления площадь поверхности белка, доступной растворителю, уменьшается. Для моделей Nip7 P. abyssi эта площадь меньше и ее относительные изменения меньше, чем у Nip7 из P. furiosus.

Ключевые слова: структура белка; молекулярная динамика; высокое давление; пьезофилы; Pyrococcus.

Введение

Давление – один из важных факторов внешней среды. Большинство живых организмов обитает при атмосферном давлении ~0,1 МПа, а воздействие на них повышенного давления нарушает работу таких систем, как репликация, транскрипция, трансляция и синтез белка, транспорт веществ через мембраны, и приводит к гибели клеток [1]. Однако существуют организмы-пьезофилы, которые способны жить при давлениях в тысячу раз больших атмосферного, например на дне Марианской впадины (~100 МПа). Изучение механизмов адаптации этих организмов к высоким давлениям позволит выявить факторы, обеспечивающие устойчивость живых систем в экстремальных условиях, а их белки могут быть использованы в биотехнологии [2].

На молекулярном уровне одним из факторов нарушения работы клетки при воздействии высоких давлений является дестабилизация белков, которые выполняют важнейшие функции. Эксперименты показали, что высокие давления могут нарушать структуру белков и их комплексов. При увеличении давления до 200 МПа происходит распад белковых комплексов. При давлении 500 МПа может наблюдаться частичная денатурация белка, и при 1 ГПа он полностью денатурирует [3]. Предполагают, что ключевым фактором такой дестабилизации является проникновение молекул растворителя внутрь гидрофобного ядра белка [1].

Изучение механизмов устойчивости белков при повышенных давлениях представляет большой интерес. В последнее время при решении этих задач все больше используется компьютерное моделирование динамики белка. Это направление исследований становится все более актуальным, так как молекулярная динамика позволяет проникнуть в суть процессов, происходящих в растворе с биомолекулами, получать распределения термических свойств молекул, анализировать ансамбли конформаций белка.

Так, в работе [4] проводилось моделирование молекулярной динамики репрессора Arg при температуре 300 К, на протяжении 500 пикосекунд, в диапазоне давлений от 0,1 до 100 МПа. Результаты показали, что значение среднеквадратичного отклонения RMSD при температуре 300 К и атмосферном давлении оставалось на уровне 0,2 нм на протяжении всего моделирования. При температуре 400 К белок терял свою структуру и наблюдалась денатурация. Увеличение давления до 1 000 МПа при нормальной температуре не давало никаких особых изменений в структуре репрессора, при 400 К и 1000 МПа не наблюдалась денатурация белка, однако присутствовало увеличение значений RMSD. В работе [5] методом молекулярной динамики исследовалось влияние высокого давления на равновесие между двумя формами белковых структур – миоглобина и нейроглобина. Результаты показали, что основным эффектом влияния давления – это снижение подвижности белка без значительных структурных изменений.

В настоящей работе было проведено исследование структур белков Nip7 архей рода *Pyrococcus* из мелководных термальных источников (*P. furiosus* [6], глубины обитаний до 100 м) и глубоководных, пьезофилов (*P. abyssi* [7], глубины обитания около 2 200 м). Белок Nip7 вовлечен в биогенез рибосом и участвует в процессинге 27S пре-рРНК и в образовании 60S субъединицы рибосом [8]. Атомная модель данного белка содержит два независимых мономера и 252 молекулы воды. Мономеры не содержат структурных различий и формируют димер, который, по мнению авторов, образовался в результате кристаллизации и не имеет биологической значимости. Мономер Nip7 состоит из двух альфа-бета доменов (рис. 1). N-терминальный домен состоит из пяти антипараллельных β -листов, окруженных тремя α -спиралями и одной спиралью 3_{10} . РНК-связывающий C-терминальный домен включает аминокислотные остатки с 95-го по 159-й и состоит из β -листов, одной

α -спирали и одной короткой спирали 3_{10} [9]. Аминокислоты аргинин и лизин R151, R152, K155, K158 С-терминального домена формируют положительно заряженную область, которая способствует связыванию белка и РНК.

Мы сравнили динамику белков Nip7 из двух организмов при различных давлениях между собой, чтобы выявить возможные отличия структурных свойств этих белков. В результате было показано, что деформация структуры Nip7 мелководной археи *P. furiosus* в целом больше, чем у глубоководной *P. abyssi*. Структурные деформации РНК-связывающего сайта при высоких давлениях больше у белка из *P. furiosus*. Анализ компьютерных моделей белков Nip7 из *P. abyssi* и *P. furiosus* показал, что с увеличением давления площадь поверхности белка, доступной растворителю, уменьшается. Для моделей Nip7 *P. abyssi* эта площадь меньше и ее относительные изменения меньше, чем у Nip7 из *P. furiosus*. Полученные результаты согласуются с гипотезой о важности взаимодействия белка с растворителем при увеличении давления.

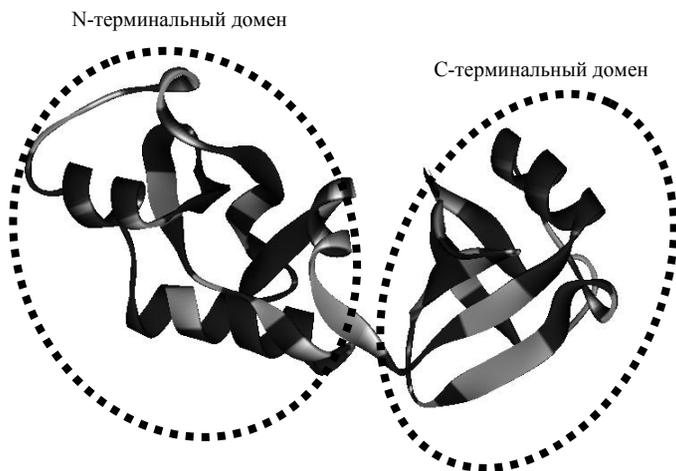


Рис. 1. Трехмерная структура белка Nip7 *P. furiosus*. Серым цветом выделены остатки, которые отличаются у белков *P. abyssi* и *P. furiosus*, черным – идентичные остатки. Пунктиром выделены домены белка. Изображение структуры получено с помощью программы Accelrys Discovery Studio Visualizer [10]

Материалы и методики исследования

Структуры белков Nip7 *P. abyssi* и *P. furiosus*. Белки Nip7 были выбраны по следующим причинам. Во-первых, для них был идентифицирован режим движущего отбора в ходе эволюции археями *Pyrococcus* [11]. Следовательно, функция этого белка может быть важной для адаптации организмов к изменению давления среды. Во-вторых, для гомолога *P. abyssi* известна

пространственная структура [9]. В-третьих, длина его полипептидной цепи невелика, составляет 166 аминокислотных остатков, что приемлемо для моделирования. В-четвертых, последовательности Nip7 *P. abyssi* и его гомолога у *P. furiosus* выравниваются без делеций/вставок, уровень сходства последовательностей составляет около 75%, что позволяет моделировать пространственную структуру гомолога у *P. furiosus* без реконструкции петель (этапа предсказания структуры белка по гомологии, который вносит существенные ошибки).

Трехмерная структура белка Nip7 *P. abyssi* была взята из банка данных PDB [12], идентификационный номер 2P38. Структура белка Nip7 *P. furiosus* отсутствует в банке данных PDB, поэтому генерация ее модели производилась с помощью программы SWISS-MODEL [13]. Данная программа осуществляет построение модели белка по гомологии с известной структурой. На вход подавалось выравнивание аминокислотных последовательностей двух рассматриваемых белков без делеций и вставок (рис. 2).

```

      1.....10.....20.....30.....40.....50.....60
P.A: MSGELRVRASSWELDLILKEAEKYGELLHEFFCVVEGKYRDVYAVNEEVVKI IEDINMR
P.F: MNGEIIARRASSWEDLILKEAEKFGTLVHNFFAIVEGKYRDVYAVNNEEVVKI IEDLTVR
      ····BBB···AAAAAAAAAAAA···BBB···BBBBB···BBBBBB·AAAAA·····
      .....70.....80.....90.....100.....110.....120
P.A: PYSLGTfVVGtIRVDENLVEKfYpNLEFFSLIKLEKnyVILGPKASFLFTTGKDAPKEAVR
P.F: PfALGTfVVGMIkVDENLVEKfYpALEFFtFVDtEKnyAVLgPKASFLFTTGKdVpKkAVR
      ····BBBBBBBBB·····BBBBB·AAAA·BBB···BBBB·AAAAAAAA·····BB
      .....130.....140.....150.....160.....166
P.A: EIKWQGSKRvVVLNDLGDIIIGIGLINPKSDRRFIKnlKdVGEFLRR
P.F: KLVWkGSKkIVVMnELGDVlGIGrINpSNEEKfIKNItdVGAfLRk
      BBB·····BBBBB·····BBBBBBB·····BBBBB·····

```

Рис. 2. Сравнение последовательностей Nip7 из *P. abyssi* (P.A – верхняя строка выравнивания) и *P. furiosus* (P.F – вторая строка выравнивания).

Над выравниванием последовательностей приведена нумерация позиций белка.

Под выравниванием приведен тип вторичной структуры аминокислотного остатка согласно разметке DSSP (A – α -спирали, B – β -нити, пробел – прочие типы вторичной структуры)

Моделирование молекулярной динамики

Для создания модели белка в окружении молекул раствора использовалась программа WHAT IF [14]. Модель включает 1568 атомов белка и 50 000 молекул воды.

Моделирование молекулярной динамики пространственной структуры белка осуществлялось с помощью пакета программ GROMACS [15] с использованием молекулярного силового поля GROMOS 45A3. Мы моделировали белок при температуре 300 К в кубической ячейке с ребром 6 нм, окруженный молекулами воды и ионами для компенсации заряда, при давлениях 0,1 10, 100, 150 и 200 МПа. Параметры моделирования были установлены, как рекомендовано в работе Коллинза и соавт. [16]. Время моделирования

равнялось 300 пикосекундам. Это время соответствует небольшим флуктуациям в структуре белка и является достаточным для того, чтобы программа привела белок в состояние равновесия.

Для анализа брались структуры после достижения равновесия в процессе моделирования в системе «белок – растворитель». Равновесие достиглось начиная с 250 пс. Таким образом, в рассмотрение брались структуры с момента моделирования 250 до 300 пс через каждые 5 пс, всего 11 структур. Для сравнения бралась исходная модель в начальный момент времени (0 пс).

Анализ результатов моделирования

Вторичная структура рассчитывалась программой DSSP [17].

Отклонение структур характеризовали среднеквадратичным отклонением координат С-альфа атомов (RMSD). Эта величина измеряется в ангстремах ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ м}$) и вычисляется по следующей формуле:

$$\text{RMSD}(v, w) = \sqrt{\left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (v_{ix} - w_{ix})^2 + (v_{iy} - w_{iy})^2 + (v_{iz} - w_{iz})^2 \right)}$$

где v, w – структуры белка; i – номер остатка; j – координаты С-альфа атома ($j=x, y, z$); v_{ij}, w_{ij} – значения координаты j С-альфа атома остатка i структуры v ; n – общее количество остатков. Для полностью совпадающих структур RMSD равно 0; чем больше ее значения – тем выше различия в структурах белков. Все структурные характеристики моделей, такие как значение RMSD и поверхность, доступная растворителю, рассчитывались программами из пакета GROMACS.

Для того чтобы определить, какие участки структуры белка подвержены наибольшим изменениям в результате воздействия давления, мы рассчитывали для каждого остатка m локальное отклонение структуры полипептидной цепи RMSD_{qm} :

$$\text{RMSD}_q(v, w) = \sqrt{\left(\frac{1}{q} \sum_{i=n-\frac{q}{2}}^{i < n + \frac{q}{2}} (v_{ix} - w_{ix})^2 + (v_{iy} - w_{iy})^2 + (v_{iz} - w_{iz})^2 \right)}$$

RMSD_{qm} по смыслу аналогичен RMSD, но оценивается в пределах скользящего окна размером $q=10$ аминокислот. Величины v_{ij}, w_{ij} определены выше, m – индекс положения окна в последовательности ($q/2 < m \leq n - q/2$).

Результаты исследования и обсуждение

На рис. 3 приведены значения RMSD между исходной моделью белка Nip7 *P. furiosus* и моделями на разных шагах моделирования. Из рис. 3 видно, что после шага моделирования, соответствующего времени 250 пс, RMSD выходит на плато 2–3 Å и в дальнейшем не возрастает. Это означает, что модель белка достигает состояния равновесия, является стабильной и

не подвергается разворачиванию полипептидной цепи при времени моделирования до 300 пс. Аналогичную стабилизацию значений RMSD мы наблюдали и для всех остальных моделей при исследованных нами давлениях. Таким образом, все полученные нами модели были стабильными на интервалах до 300 пс.

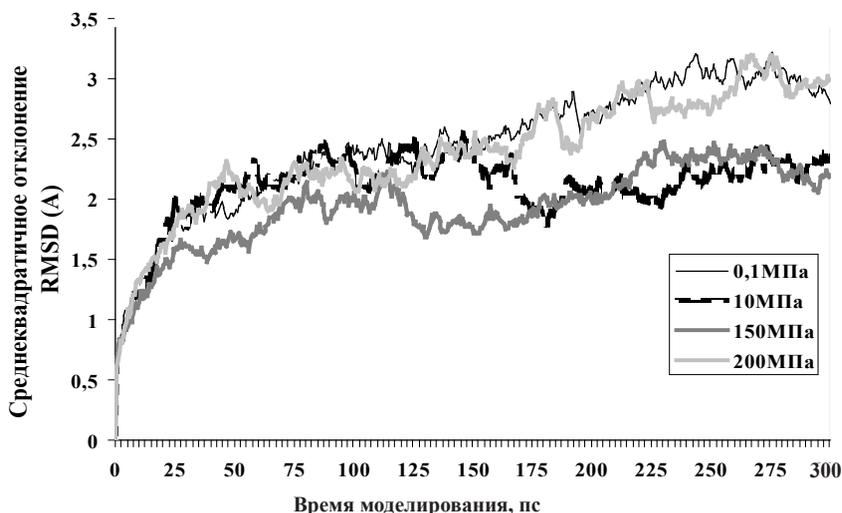


Рис. 3. Зависимость среднеквадратичного отклонения RMSD от времени моделирования для белка Nip7 *P. furiosus* при различных значениях давления

Для того чтобы исследовать, какие участки белка подвергаются структурным изменениям при воздействии давлений, мы сравнили профиль локальных изменений структуры белка $RMSD_q$ для белков Nip7 *P. furiosus* и *P. abyssi* при различных давлениях. Пример профиля при давлении 150 МПа приведен на рис. 4. Интересно отметить, что для некоторых участков белка и в одном и в другом белке наблюдается сильное отклонение от исходной структуры (позиции 59–77). В то же время для профиля отклонений есть и отличия. В целом отклонения структуры для белка *P. furiosus* больше, чем для *P. abyssi*. Интересно, что отличия $RMSD_q$ наблюдаются и для участка связывания РНК: отклонения от исходной структуры меньше в этих районах для белка *P. abyssi*, что может свидетельствовать о большей стабильности РНК связывающего домена этого белка (рис. 4).

Известно, что одним из основных факторов дестабилизации белковой структуры при действии высокого давления является взаимодействие с растворителем. Для того чтобы проанализировать, как меняется взаимодействие с растворителем при воздействии на структуру белка высокого давления, мы рассчитали для разных давлений среднюю площадь остатков, доступных растворителю для моделей белков Nip7 *P. abyssi* и *P. furiosus* и разных давлений. Результаты представлены на рис. 5.

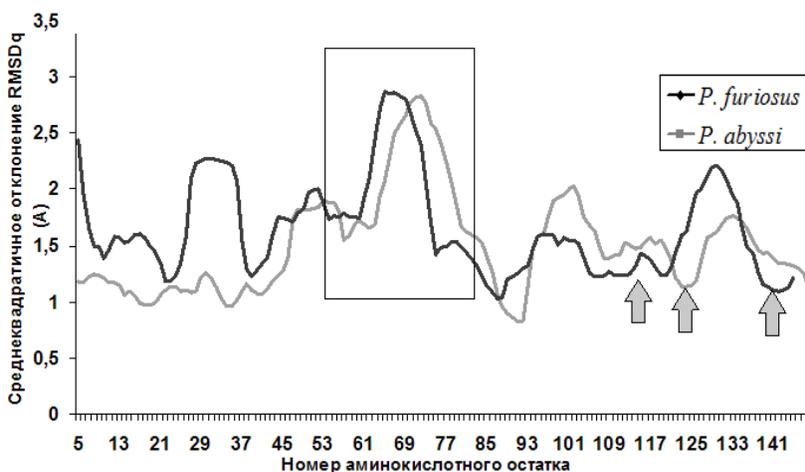


Рис. 4. Зависимость среднеквадратичного отклонения $RMSD_q$ от номера аминокислотного остатка для двух исследуемых белков при давлении 150 МПа. Стрелками отмечены участки связывания РНК [9], которые являются достаточно консервативными, и с увеличением давления значение их $RMSD_q$ практически не изменяется. Прямоугольником отмечена область наибольшего изменения значения $RMSD_q$ для обоих белков

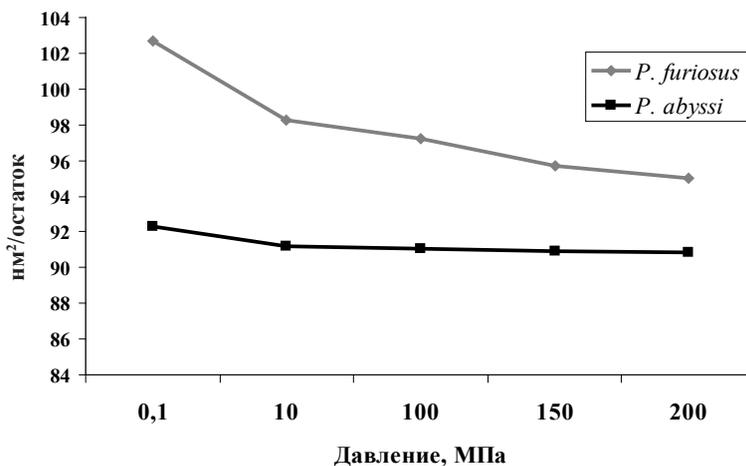


Рис. 5. График зависимости средней доступности остатка растворителю от давления для двух исследуемых белков

Из рис. 5 видно, что для белка Nip7 *P. furiosus*, который обитает на мелководье, средняя доступность остатка растворителю выше, чем у *P. abyssi*. Кроме того, наибольшее изменение средней доступности остатка растворителю происходит при переходе от 0,1 к 100 МПа, что соответствует природным давлениям: 0,1 МПа – атмосферное давление, 100 МПа – давление на дне Марианской впадины. Это означает, что наиболее сильные изменения

площади поверхности этих белков происходят в интервалах давлений, характерных для глубин Мирового океана.

Из рис. 6 видно, что доступность гидрофильных остатков растворителю практически остается неизменной. Поэтому основной вклад в изменение доступности остатков растворителю вносят гидрофобные аминокислоты белковой структуры.

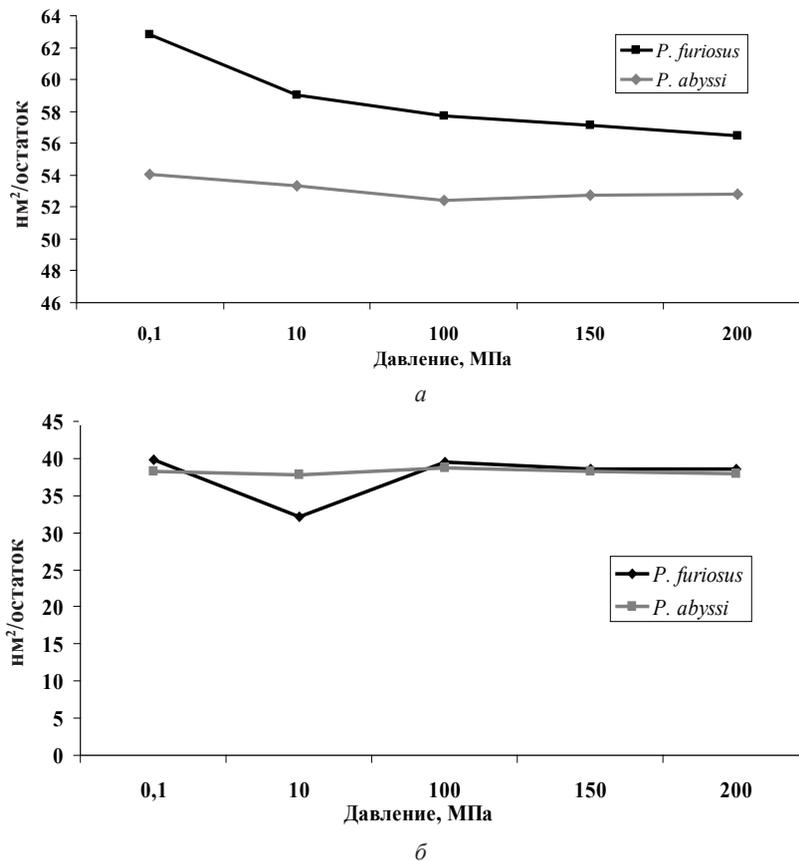


Рис. 6. Изменение средней доступности остатков растворителю в зависимости от давления для гидрофильной (б) и гидрофобной (а) составляющих поверхности

Полученные результаты согласуются с гипотезой о важном вкладе взаимодействия белка с растворителем при воздействии повышенных давлений.

Заключение

В работе проведено сравнение компьютерных моделей трехмерных структур белков Nip7 из *P. abyssi* и *P. furiosus* при давлениях от 0,1 до 200 МПа. Показано, что деформация структуры Nip7 мелководной *P. furiosus* в целом больше, чем глубоководной *P. abyssi*. Структурные деформации

РНК-связывающего сайта при высоких давлениях больше у белка из *P. furiosus*. Кроме того, анализ компьютерных моделей белков Nip7 из *P. abyssi* и *P. furiosus* показал, что с увеличением давления площадь поверхности белка, доступной растворителю, уменьшается. Для моделей Nip7 *P. abyssi* эта площадь меньше и ее относительные изменения меньше, чем у Nip7 из *P. furiosus*. Полученные результаты согласуются с гипотезой о важности взаимодействия белка с растворителем при увеличении гидростатического давления.

Литература

1. Winter R., Oger P. Origins of life and biochemistry under high-pressure conditions // Chemical Society Reviews. 2006. № 35. P. 858–875.
2. Bull A.T., Ward A.C., Goodfellow M. Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. № 64. P. 574–606.
3. Doster W., Petry W., Schober H. High pressure – unfolding of myoglobin studied by dynamic neutron scattering // Chemical Physics. 2003. P. 383–387.
4. Trzesniak D., Lins R.D., van Gunsteren W.F. Protein under pressure: molecular dynamics simulation of the arc repressor // Proteins. 2006. № 65. P. 136–144.
5. Capece L., Marti M.A., Bidon-Chanal A. et al. High pressure reveals structural determinants for globin hexacoordination: Neuroglobin and myoglobin cases // Proteins. 2009. № 75. P. 885–894.
6. Fiala G., Stetter K.O. *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C // Arch Microbiol. 1986. № 145. P. 56–61.
7. Erauso G., Reysenbach A-L., Godfroy A., Meunier J-R. et al. *Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent // Arch Microbiol. 1993. № 160. P. 338–349.
8. Bassler J., Grandi P., Gadal O. et al. Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export // Mol. Cell. 2001. № 8. P. 517–529.
9. Coltri P., Guimaraes B., Garanto D., Luz J. Structural Insights into the Interaction of the Nip7 PUA Domain with Polyuridine RNA // Biochemistry. 2007. № 46. P. 14177–14187.
10. Sali A., Pottertone L., Yuan F. et al. Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER // Proteins. 1995. № 23. P. 318–326.
11. Gunbin K.V., Afonnikov D.A., Kolchanov N.A. Molecular evolution of the hyperthermophilic archaea of the *Pyrococcus* genus: analysis of adaptation to different environmental conditions // BMC Genomics. 2009. № 10. P. 639.
12. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G. et al. The Protein Data Bank // Nucleic Acids Research. 2000. № 28. P. 235–242.
13. Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M.C. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server // Nucl. Acids Res. 2003. № 31. P. 3381–3385.
14. Vriend G. WHAT IF: A molecular modeling and drug design program // J. Mol. Graph. 1990. № 8. P. 52–56.
15. Van der Spoel D., Lindahl E., Hess B. et al. GROMACS: Fast, Flexible and Free // J. Comp. Chem. 2005. № 26. P. 1701–1718.
16. Collins M.D., Hummer G., Quillin M.L., Matthews B.W. and Gruner S.M. Cooperative water filling of a nonpolar protein cavity observed by high-pressure crystallography and simulation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. № 102. P. 16668–16671.
17. Kabsch W., Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features // Biopolymers. 1983. № 22. P. 2577–2637.

Поступила в редакцию 04.05.2011 г.

Kirill E. Medvedev, Dmitry A. Afonnikov, Yury N. Vorobjev

*Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch
of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

**MOLECULAR DYNAMICS STUDY OF HIGH PRESSURE
INFLUENCE ON THE STRUCTURE OF Nip7 PROTEIN FROM
DEEP-SEA AND SHALLOW-WATER ARCHAEA**

Pressure is an important environmental factor for living organisms. Most of them live at atmospheric pressure of 0,1 MPa. At high pressure the functioning of a number of important cellular systems such as replication, transcription, translation and protein synthesis and transport of substances through the membrane is disrupted. This results in cell malfunction and death. However, there exist organisms, piezophiles, which are able to live and proliferate at pressures about one thousand times more than atmospheric, for example, at the bottom of the Mariana Trench (~ 100 MPa). The study of adaptation mechanisms of these organisms to high pressure environment will allow to identify the factors that provide resistance of living systems to extreme conditions. Their proteins can be used in biotechnology.

One of the damaging factors at high pressures is the destabilization of proteins performing important functions. It was experimentally shown that high pressure destabilizes the structure of proteins and their complexes. Protein complexes tend to dissociate at pressures of about 200 MPa. The pressure of 500 MPa induce partial denaturation of proteins. The pressure of 1 GPa result in complete unfolding of protein chain. It is believed that the main factor of such instability is the penetration of solvent molecules into the hydrophobic core of the protein. Studies of the mechanisms of protein stability at high pressures are of great importance. Recently, computer simulations of protein dynamics were implemented to tackle this problem. This field of research is becoming increasingly important as molecular dynamics provides a detailed picture of the biomolecular processes in solution. It allows to receive the distribution of the thermal properties of molecules and analyze the ensemble of conformations of the proteins.

*We study the structures of archaeal proteins Nip7 from *Pyrococcus* species from shallow hydrothermal vents (*Pyrococcus furiosus*, the depth of habitat is about 100 m) and deep-sea piezophiles (*Pyrococcus abyssi*, the depth habitat is about 2200 m) at different pressures. Nip7 protein participates in ribosomal biogenesis and is involved in the processing of 27S pre-rRNA and the formation of 60S ribosomal subunits.*

*We compared computer models of three-dimensional structures of Nip7 proteins from *P. abyssi* and *P. furiosus* at pressures ranging from 0,1 MPa to 200MPa. It was shown that the deformation of the structure Nip7 shallow *P. furiosus* is larger than for the deep-sea *P. abyssi*. *P. furiosus* protein had larger structural deformation of the RNA-binding site at high pressure. Moreover, analysis of computer models of Nip7 proteins from *P. abyssi* and *P. furiosus* demonstrated that with the increasing pressure the solvent-accessible surface area decreases. This area is smaller for models Nip7 *P. abyssi* and its relative change is less than that from *P. furiosus*. Obtained results are consistent with the hypothesis about the importance of protein interaction with the solvent while the pressure increases.*

Key words: *protein structure, molecular dynamics, high pressure; piezophiles; *Pyrococcus*.*