

Изучение механизма распознавания субстратов с участием подвижных элементов структуры активных центров ферментов 3-гидроксибензоатгидроксилазы и 2-гидроксибифенил-3-монооксигеназы с использованием суперкомпьютера*

К.Е. Копылов¹, Д.А. Суплатов², В.К. Швядас²

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет¹, Факультет биоинженерии и биоинформатики и Научно-исследовательский институт имени А.Н. Белозерского²

Эволюционно родственные ферменты 3-гидроксибензоатгидроксилаза из *Comamonas testosteroni* (номер в PDB – 2DKH) [1] и 2-гидроксибифенил-3-монооксигеназа из *Pseudomonas azelaica* (номер в PDB – 5BRT) [2] используются в тонком органическом синтезе для региоспецифичного синтеза различных фенольных соединений. Они являются NAD(P) и FAD-зависимыми монооксигеназами, катализирующими окисление различных ароматических субстратов кислородом воздуха. Особенностью строения этих ферментов является наличие нескольких подвижных петель в активном центре, что делает невозможным расшифровку полноатомной трехмерной структуры белка методом рентгеноструктурного анализа. Соответствующие участки не содержат аминокислотных остатков, непосредственно участвующих в каталитическом превращении. Тем не менее, проведенное нами молекулярное моделирование показало, что продуктивное связывание специфических субстратов не наблюдается в активных центрах ферментов, из которых исключены соответствующие подвижные фрагменты.

Для установления трехмерной организации активных центров с учетом подвижных элементов структуры был использован метод Kinematic Closure [3], реализованный в программном пакете Rosetta. Активные центры 3-гидроксибензоатгидроксилазы и 2-гидроксибифенил-3-монооксигеназы содержат две и четыре подвижные петли, соответственно, до 14 аминокислотных остатков в каждой. Анализ молекулярных систем с таким большим количеством степеней свободы требует значительных вычислительных ресурсов. Пакет Rosetta был установлен на суперкомпьютере «Ломоносов-2» с возможностью запуска приложений в параллельном режиме с использованием протокола Job Distributor 2. На основе кристаллографических структур 2DKH и 5BRT было предсказано по 7000 структурных вариаций активных центров каждого фермента. Анализ полученных конформаций показал, что в определенных случаях аминокислотные остатки подвижных петель располагаются в непосредственной близости от сайта связывания субстрата и таким образом могут играть ключевую роль в его узнавании.

На следующем этапе работы для установления конкретного молекулярного механизма узнавания субстратов в активном центре выбранных ферментов будет проведен массивно-параллельный докинг на суперкомпьютере «Ломоносов» с использованием оригинального протокола [4,5]. GPU-ускорители Tesla K40s, установленные на суперкомпьютере «Ломоносов-2», и CUDA-версия пакета молекулярной динамики AMBER14 будут использованы для изучения предреакционного положения субстратов в активном центре и уточнения механизма связывания.

Литература

1. Hiromoto T. et al. Crystal structure of 3-hydroxybenzoate hydroxylase from *Comamonas testosteroni* has a large tunnel for substrate and oxygen access to the active site //Journal of molecular biology. 2006. Vol. 364. No. 5. P. 878-896.

* Работа выполняется при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-34-01157)

2. Kanteev M. et al. A crystal structure of 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase with bound substrate provides insights into the enzymatic mechanism // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2015. Vol. 1854. No. 12. P. 1906-1913.
3. Mandell D. J., Coutsiaris E. A., Kortemme T. Sub-angstrom accuracy in protein loop reconstruction by robotics-inspired conformational sampling // *Nature methods*. 2009. Vol. 6. No. 8. P. 551-552.
4. Suplatov, D., Popova, N., Kopylov, K., Shegai, M., Voevodin, V., Švedas, V. High-performance computing in bioinformatic analysis of protein superfamilies to design enzymes with new properties. // *Russian Supercomputing Days 2015*, 2015. P. 537.
5. Suplatov, D., Popova, N., Zhumatiy, S., Voevodin, V., Švedas, V. Parallel workflow manager for non-parallel bioinformatic applications to solve large-scale biological problems on a supercomputer // *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2016. Vol. 14. No. 2. P. 1641008.