

Моделирование комплекса каталазы «А» *Saccharomyces Cerevisiae* и НАДФН2 для предсказания его геометрии

Егоров Д. А., ГУЗ МЗ СО Областная детская клиническая больница №1, г. Екатеринбург
Савельев Л. И., к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ГОУ ВУП УГМА Росздрава, г. Екатеринбург
Цвиренко С. В., д.м.н., профессор, зав. кафедры клинической лабораторной диагностики ГОУ ВУП УГМА Росздрава, г. Екатеринбург
Фечина Л. Г., ГУЗ МЗ СО Областная детская клиническая больница №1, г. Екатеринбург

Modeling of complex of catalase «A» from *Saccharomyces Cerevisiae* with NADPH for it's geometry prediction

Yegorov D. A., Saveliev L. I., Tsvirenko S. V., Fechina L. G.

Резюме

Каталаза «А» из *Saccharomyces cerevisiae* образует слабый комплекс с НАДФН2, поэтому его геометрия в рентгеноструктурных исследованиях не установлена. Цель настоящей работы – предсказание геометрии НАДФН2 и его фрагментов – неорганических монофосфатов и 2',5'-АДФ в связанном с ферментом состоянии методом молекулярно-механического моделирования. Результаты расчетов позволили надежно локализовать сайт связывания 2'-фосфата НАДФН2 в этой каталазе, а также предложить обоснованные модели 2',5'-АДФ в форме индивидуальной молекулы и в составе НАДФН2 в комплексе с каталазой «А», согласующиеся с известными экспериментальными данными по электронной плотности. Положение никотинамидной части НАДФН2 на основе анализа полученных моделей окончательно не установлено.

Ключевые слова: комплекс каталаза-НАДФН2, молекулярно-механическое моделирование, предсказание геометрии.

Summary

NADPH weakly binds to Catalase «A» from *Saccharomyces cerevisiae*, so geometry of bound ligand is not known from X-ray crystallography. To resolve this issue complexes of catalase «A» from *Saccharomyces cerevisiae* with NADPH and its fragments – inorganic monophosphates and 2',5'-ADP was modeled with molecular mechanics methods. Binding site of NADPH 2'-phosphate in KATA was detected and models of 2',5'-ADP as individual molecule and as fragment of NADPH in complexes with catalase «A» were proposed. These model data are in good agreement with known experimental results (electron density). Position of nicotinamid-ribosid is not determined.

Keywords: catalase-NADPH complex, molecular mechanics modeling, geometry prediction.

Введение

Гемсодержащие монофункциональные каталазы – ферменты, проявляющие высокую активность в катализе реакции разложения пероксида водорода на воду и молекулярный кислород. Интересной особенностью этих ферментов является их способность связывать НАДФН2, с которым, однако, они взаимодействуют по-разному. Каталазы из эритроцитов человека (ЧЭК) и *Proteus mirabilis* (ПМК) образуют очень прочные комплексы (константы диссоциации – 5-10 нмоль [1, 2]). Фермент из *Micrococcus*

lysodeicticus (МЛК) связывает этот лиганд слабее [3], а каталаза *Helicobacter pylori* (ГПК, [4]) и каталаза «Ф» *Pseudomonas syringae* (КАТФ, [5]) комплексы с НАДФН2 не образуют. Кроме того, в разных каталазах НАДФН2, возможно, имеет разную геометрию, что связывают с различиями в первичной структуре сайта связывания [3]. Функция НАДФН2 в каталазах окончательно не установлена. Предполагается, что он участвует в восстановлении побочных продуктов взаимодействия гема и пероксида водорода, предохраняя фермент от необратимого ингибирования субстратом [6, 7]. Изучение геометрических особенностей комплексов каталаз с НАДФН2 может способствовать уточнению его роли в этих ферментах и лучше пониманию механизма их функционирования.

Каталаза «А» из пивных дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*, КАТА) образует малопрочный комплекс с НАДФН2 (константа диссоциации меньше 2 мкмоль [8]).

Ответственный за ведение переписки -

Егоров Д. А.,

620149, г. Екатеринбург,

ул. Серафимы Дерябиной, д. 32,

ccrj@mail.ru

По этой причине в рентгеноструктурном анализе (РСА) координаты НАДФН2 в КАТА не получены. Предполагается, что образование комплекса обесценивает 2',5'-АДФ, а никотинамидный фрагмент может играть стабилизирующую роль [9]. Поэтому важное значение имеет исследование геометрии комплексов с фрагментами НАДФН2 – неорганическими монофосфатами и 2',5'-АДФ. Компьютерное моделирование не имеет присущих экспериментальному подходу ограничений и может помочь в изучении: связывания КАТА с НАДФН2 и его фрагментами. Программа «AutoDock» – один из наиболее успешных методов для предсказания конфигурации молекулярных комплексов [10]. Она имеет эффективный алгоритм генерации моделей, однако ее энергетическая функция, основанная на силовом поле «Amber», может приводить к неправильному отбору моделей сложных лигандов, особенно содержащих органические фосфаты или углеводные фрагменты [11, 12]. В нашем предварительном исследовании также обнаружена неспособность «AutoDock» к предсказанию правильной геометрии комплекса НАДФН2 и бычьей печеночной каталазы [13]. Применение силового поля «MMFF94s» к оценке молекулярных взаимодействий в биологических системах позволяет получать наиболее адекватные по сравнению с другими силовыми полями результаты [14]. В настоящей работе для предсказания геометрии комплексов КАТА с НАДФН2 и его фрагментами – неорганическими монофосфатами и 2',5'-АДФ – использована комбинированная схема построения моделей, основанная на генерации конфигураций с помощью «AutoDock» и отборе наиболее перспективных из них по энергии, рассчитанной в силовом поле «MMFF94s».

Цель настоящей работы – предсказание геометрии НАДФН2 и его фрагментов – неорганических монофосфатов и 2',5'-АДФ в связанном с ферментом состоянии методом молекулярно-механического моделирования.

Материалы и методы

Для моделирования использованы кристаллографические координаты КАТА, полученные из Белковой Базы Данных (Protein Data Bank [15, 16], PDB, код 1a4c [9]). В соответствии с условиями выделения (pH=8.5) в работе изучены модели комплексов КАТА с H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻, PO₄³⁻, 2',5'-АДФ4- и НАДФН24-.

К КАТА с помощью программы «Reduce» [17] в присутствии связанных лигандов (гем, НАДФН2) и кристаллизационной воды добавляли атомы водорода. После протонирования все молекулы лигандов и воды были удалены из структурного файла КАТА. К фенолам тирозина-358, взаимодействующим с гемовым железом, после удаления гемов добавляли атомы водорода с помощью «Reduce». Таким образом, белок использован в форме апотетрамера.

Стартовые трехмерные структуры 2',5'-АДФ4- и НАДФН24- для построения моделей комплексов взяты из субъединицы «А» ЧЭК (код PDB 1dgb, [18]) после протонирования и двухстадийного парного структурного выравнивания аминокислотных последовательностей

субъединиц «А» двух ферментов, проведенного в программе «Chimera» с параметрами «по умолчанию» [19]. Структуры фосфатов НАДФН24- в ЧЭК несколько различаются между собой, что препятствует их использованию в качестве моделей неорганических монофосфатов. Поэтому для фосфатных лигандов сначала из SMILES-строк, созданных в программе «CACTVS» [20], генерировали первичные одиночные конформации в программе «Balloon» [21] без оптимизации. Итоговые координаты H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻ и PO₄³⁻ получены путем последовательной оптимизации первичных конформаций в квантово-химической программе «GAMESS-US» [22, 23] (RHF, базисы AM1, MINI, 6-31G, 6-31G****).

Атомные заряды неорганических фосфатов для «AutoDock» рассчитаны в программе «RESP» [24] из электростатического потенциала, полученного в программе «GAMESS-US» (RHF, базис 6-31G*) по схеме Коллмана-Мерца для 10 октоаномных оболочек с конечной плотностью ~ 2500 точек на один атом, согласно рекомендациям [25]. При вычислении потенциала использовали квантово-химически оптимизированные координаты H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻ и PO₄³⁻. Атомные заряды 2',5'-АДФ4- вычислены по той же схеме, но для оптимизированной нами в силовом поле «MMFF94s» геометрии. Заряды для НАДФН24-, полученные по сходной методологии, любезно предоставлены профессором У. Райдом (кафедра теоретической химии Стокгольмского университета, Швеция).

Генерацию моделей комплексов проводили с помощью «AutoDock- 3.05». Фермент находился в полностью неподвижной (ригидной) форме. В его субъединицу «А» встраивали полностью конформационно подвижные H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻ и ригидный PO₄³⁻, 2',5'-АДФ и НАДФН2 встраивали в полностью подвижных формах в кристаллографических стартовых конформациях. Каждый лиганд моделировали отдельно от остальных.

В «AutoDock» применяли гибридный алгоритм генетического глобального поиска и локальной минимизации по Солису-Веттсу. Критерии остановки – 25*106 оценок энергии или 270*103 генераций конфигураций. Моделируемый объем в ферментах – куб с длиной ребра 37.5 Å (100 ячеек по 0.375 Å в каждом направлении), с центром, совмещенным с центром НАДФН24- из ЧЭК. Шаг перемещения лигандов – 0.5 Å, поворота – 15Å, изменения двугранных углов – 15 Å. Для каждой пары лиганд-рецептор получены 100 моделей (10 циклов по 10 запусков с отбором в каждом запуске одной конфигурации с лучшей «docking»- энергией). Окончательную подготовку фермента и лигандов для «AutoDock» провели с помощью программы «AutoDockTools-1.4» [26].

С помощью собственных программ получены «MMFF94s»-энергии модельных комплексов, экспериментальной конфигурации НАДФН2 и его фрагментов – 2',5'-АДФ и 2'-фосфата. «MMFF94s»-энергии 2'-фосфата рассчитаны в двух формах – PO₄³⁻ и HPO₄²⁻ (с заменой C2' адениновой рибозы на водород и уменьшением длины связи до 0.941 Å). Проведен также расчет комплекса КАТА с 2',5'-АДФ, выделенным из модельных комплексов с НАДФН2. Энергия образования комплексов

для «ММFF94s» определена по формуле $E = E_{\text{комплекса}} - (E_{\text{мин. рецептора}} + E_{\text{мин. лиганда}})$. Мин. рецептора - энергия кристаллографической кон-фи-гурации тетра-мерного апофермента. Мин. лиганда - энергия минимизированного в «ММFF94s» изолированного лиганда. При использовании «ММFF94s» энтро-пийный вклад и соль-ватационный эффект не учитывались.

В связи с особенностями расчета «AutoDock» энер-гии эксперименталь-ных конфигураций комплексов фер-ментов с НАДФН2 и его фрагментами недо-ступны. По этой же причине невозможно сравнение энергии «AutoDock» под-вижной и ригидной форм одного лиганда.

С помощью собственных программ среди моделей каждого комплекса провели кластерный анализ лиган-дов, схожий с реализованным в «AutoDock», отдельно по энергиям «AutoDock» и «ММFF94s». Каждый кла-стер форми-ровало из конформации лиганда в лучшей по энергии модели, не вошедшей в предыдущие кластеры, и конформаций других оставшихся моделей со средне-квадратичным отклонением координат (СКО) от лучшей менее 0.5 Å. Оценку соответствия энергии моделей их близости к модели с минимальной энергией проводили путем построения и анализа двумерных диаграмм «СКО от модели с минимальной энергией» - энергия» в програм-ме «OpenOffice Calc». С помощью программы «ChiIngsa» проводили визуальный анализ геометрии комплексов и подготовку иллюстраций.

Результаты и обсуждение

Согласно результатам структурного выравнивания аминокислотных по-следовательностей ЧЭК И КАТА, из двадцати одной аминокислоты НАДФН2-связывающего сайта ЧЭК в соответствующем сайте КАТА заменены только пять (рисунок № 1). Однако этого достаточно для ослабления прочно-сти комп-лекса КАТА-НАДФН2 в 200 раз по сравнению с аналогичным комплексом ЧЭК. Пред-полагается, что в значительной степени это обусловлено заменой связы-вающего пирофосфат гистидина-305 в ЧЭК на глутамин-302 в КАТА [9]. На рисунке №2 показано рас-

	1	2	3	4	5	6	7
ЧЭК	P-151	H-194	F-198	S-201	R-203	N-213	Y-215
КАТА	P-146	H-191	I-195	S-198	R-200	H-210	Y-212

	8	9	10	11	12	13	14
ЧЭК	H-235	K-237	Q-282	V-302	W-303	P-304	H-305
КАТА	H-232	K-234	Q-279	V-299	W-300	P-301	Q-302

	15	16	17	18	19	20	21
ЧЭК	L-310	Q-442	A-445	F-446	V-450	L-451	---
КАТА	L-307	Q-445	N-448	L-449	V-452	L-453	K-455

	22
ЧЭК	Q-455
КАТА	Q-459

Рис. №1. Результаты выравнивания аминокислот-ных последовательностей КАТА и ЧЭК в сайте связывания НАДФН2.

положение в КАТА НАДФН2 из ЧЭК после струк-турного выравнивания субъединиц «А» двух ферментов. Положе-ние амида глу-тамина-302 в КАТА препятствует его про-дуктивному взаимодействию с 5'-аде-ниновым фосфа-том (минимальное расстояние до водорода амида боковой цепи 5.359 Å). Однако 5'-никотинамидный фосфат находит-ся в том же положении в КАТА относительно атома НН глутамин-302, в котором он находится в ЧЭК относительно НН гистидина-305. Аспарагин-213 из триады связыва-ния 2'-фос-фата в ЧЭК заменен на гистидин-210 в КАТА. В КАТА обнаружена вставка лизина-455, отсутствующая в ЧЭК. 5'-фосфат НАДФН2 из ЧЭК находится в КАТА бли-же к аммонийной группе лизина-455 (4.534 Å), чем к ами-ду боковой цепи глутамин-302.

В КАТА четкая электронная плотность соответству-ет положению аде-нина 2'-фосфата, адениновой рибо-зы и 5'-никотинамидного фосфата НАДФН2 из БПК [9] (и ЧЭК), менее четкая плотность с худшим заполнени-ем соответст-вует положению оставшейся части никоти-намидной половины, а электронная плотность для 5'-аде-нинового фосфата НАДФН2 из БПК и ЧЭК в КАТА не видна [9]. Учитывая результаты структурного выравни-вания, можно предпола-гать, что 5'-адениновый фосфат в КАТА связывается лизином-455. Эта находка согласуется с предположением об альтернативных вариантах разме-щения НАДФН2 в каталазах, обусловленных разным рас-положением связывающих этот лиганд аминокислот [3].

Модели неорганических монофосфатов найдены в КАТА в двух сайтах (рисунок №3). Один из них рас-положен вне участка связывания НАДФН2 и об-разован гистидином-191, лизином-298, аспаратом-442, глута-мином-445 и ала-нином-446. В нем находятся модели единственного кластера H2PO4-. В другом сайте, около 2'-фосфата НАДФН2 из ЧЭК, лежат модели PO43- и HPO42- (максимальные СКО 1.546 и 1.618 Å соответ-ственно). Так как в КАТА 2'-фосфату НАДФН2 из ЧЭК соответствует четкая электронная плотность, отбор моде-лей по «AutoDock» и «ММFF94s» корректен для HPO42- и PO43-. Энергия «ММFF94s» 2'-фосфата НАДФН2 из

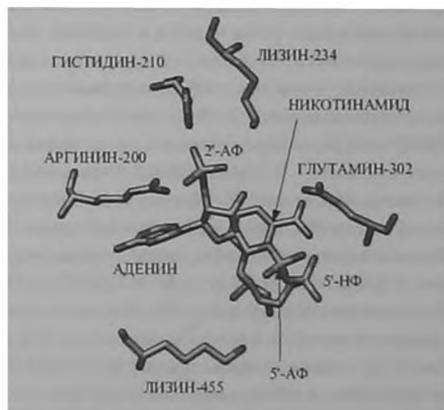


Рис. №2. Положение НАДФН2 из ЧЭК в сайте связывания КАТА.

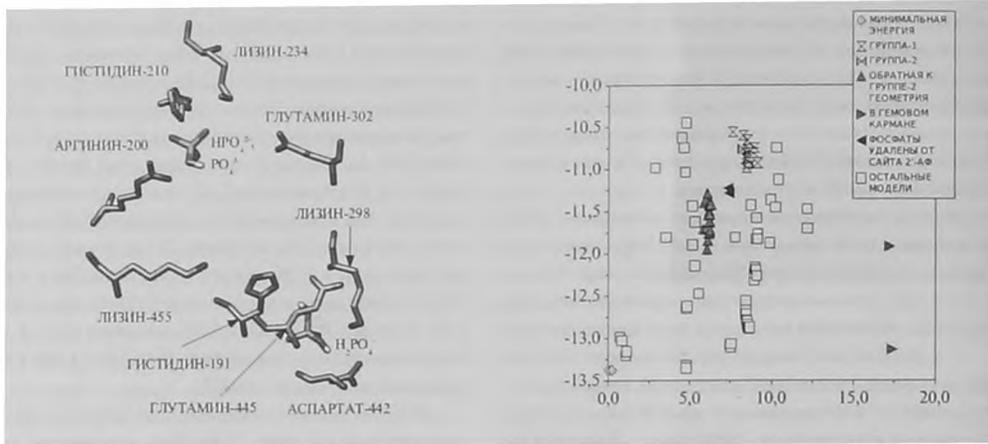


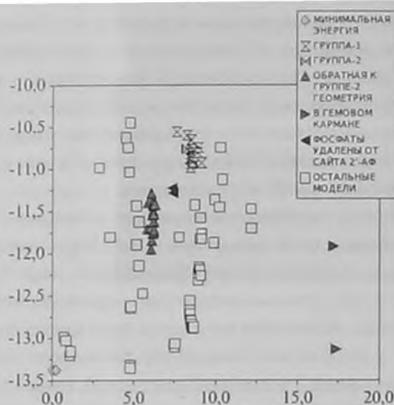
Рис. №3. Положение моделей неорганических фосфатов в КАТА.

ЧЭК в формах РО43- и НРО42- (-488.221 и -316.805 ккал/моль соответственно) существенно выше энергии моделей РО43- и НРО42- (худшие значения -559.386 и -386.555 ккал/моль соответственно). Это свидетельствует о том, что модельный сайт НРО42- и РО43- близок или совпадает с реальным сайтом связывания 2'-фосфата в КАТА. Удаление Н2РО4- от сайта связывания 2'-фосфата корректно, поскольку наличие в Н2РО4- двух концевых положительно заряженных атомов водорода, экранирующих отрицательно заряженные атомы кислорода, должно препятствовать его связыванию с положительно заряженными аминокислотами. Сайт связывания 5'-фосфатов в КАТА по результатам моделирования неорганических монофосфатов не выявлен. Это указывает на значительное превосходство сайта связывания 2'-фосфата над другими участками при взаимодействии с монофосфатной группой. Полученные результаты подтверждают предположение о ведущей роли 2'-фосфата НАДФН2 при образовании комплекса и в дискриминации НАДН2 против НАДФН2 [1].

В КАТА модели 2',5'-АДФ отклонены от 2',5'-АДФ в НАДФН2 из ЧЭК (минимальное СКО 2.163 Å). 5'-адениновый фосфат удален от его позиции в НАДФН2 из ЧЭК (минимальное СКО 2.358 Å), что согласуется с отсутствием электронной плотности в этом сайте. В двух мультикластерных группах моделей 2'-АМФ лежит около 2'-АМФ НАДФН2 из ЧЭК, которому соответствует четкая электронная плотность. В первой группе 5'-фосфат связан NH3+ лизина-455, во второй - образует водородную связь с HN глутамина-302. Еще в одной крупной группе 2',5'-АДФ имеет обратное к моделям второй группы расположение - 5'-фосфат близок к 2'-фосфату НАДФН2 из ЧЭК, а 2'-фосфат связан с HN глутамина-302. В четырех моделях оба фосфата удалены от корректного положения 2'-фосфата (две из них лежат в гемовом кармане). Остальные модели распределены по сайту связывания НАДФН2.

Распределение моделей 2',5'-АДФ в КАТА по энергии «AutoDock» в зависимости от СКО от модели с минимальной энергией носит диффузный характер, что не позволяет выявить пространственные «предпочтения»

Рис. №4. Зависимость энергии «AutoDock» моделей 2',5'-АДФ от СКО от модели с минимальной энергией.



отбора (рисунок №4). В моделях с минимальной энергией (-13.380 ккал/моль, рисунок №5) 5'-фосфат лежит около 2'-фосфата НАДФН2 из ЧЭК (максимальное СКО 1.049 Å), 2'-фосфат - в позиции никотинамидной рибозы, аденин - в сайте никотин-амида. Эти модели нереалистичны, так как позиции 2'-АМФ в известных комп-лексах каталаз и НАДФН2 отличаются несущественно [3, 9, 18, 27], а сайты связывания 2'-фосфата в КАТА и ЧЭК имеют близкое строение. Еще две модели, образующие кластер, отклоняются от минимальной по энергии модели минимум на 4.792 Å. При этом их энергия лишь немного превышает минимальную (-13.360 и -13.320 ккал/моль), а геометрия также некорректна, поскольку хотя 2'-фосфат относительно близок к корректной позиции, 5'-фосфат лежит у гуанидина аргинина-200, а аденин располагается в сайте никотинамида из ЧЭК. Энергия одной из моделей в гемовом кармане также мало отличается от минимальной (-13.140 ккал/моль). Модели с корректным положением 2'-АМФ имеют одни из худших энергий (минимум в первой группе -10.990, во второй -10.770 ккал/моль) и уступают моделям с обратным по отношению ко второй группе пространственным расположением (максимальное значение энергии -11.370 ккал/моль), а также двум моделям вне гемового кармана, в которых оба фосфата удалены от 2'-фосфата НАДФН2 из ЧЭК (максимум энергии -11.230 ккал/моль). Таким образом, отбор моделей 2',5'-АДФ по энергии «AutoDock» является ошибочным.

Отбор моделей 2',5'-АДФ в КАТА по энергии «MMFF94s» определен однозначно и направлен на селекцию реалистичных конфигураций комплекса (рисунок №6). Модели с корректным положением 2'-АМФ и 5'-фосфатом у NH3+ лизина-455 имеют минимальные энергии «MMFF94s» (-591.030...-546.265 ккал/моль) и могут отражать реальную конфигурацию комплекса (рисунок №7). Действительно, положение 2'-АМФ в этих моделях близко к положению 2'-АМФ НАДФН2 из ЧЭК, с которым удовлетворительно соотносится полученная в РСА электронная плотность и именно поэтому оно корректно, смещение же 5'-фосфата от амида боковой цепи глю-

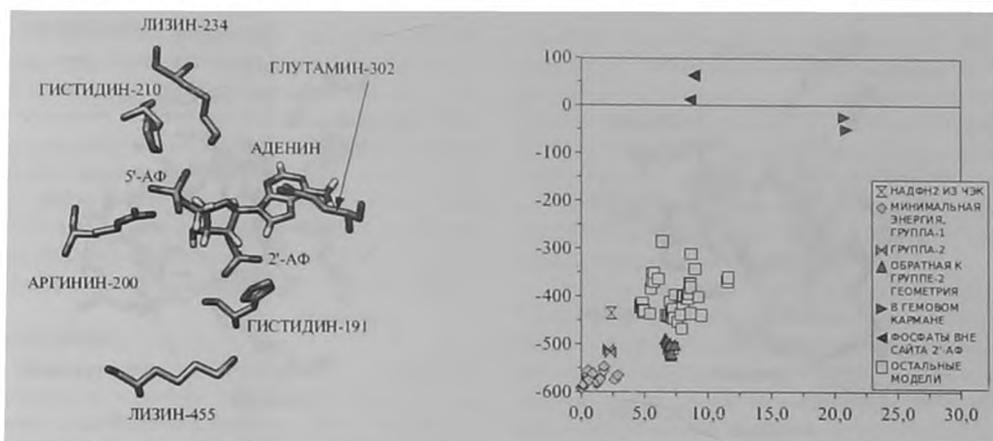


Рис. №5. Положение модели 2',5'-АДФ с минимальной энергией «AutoDock» в КАТА.

Рис. №6. Зависимость энергии «MMFF94s» моделей 2',5'-АДФ от СКО от модели с минимальной энергией.

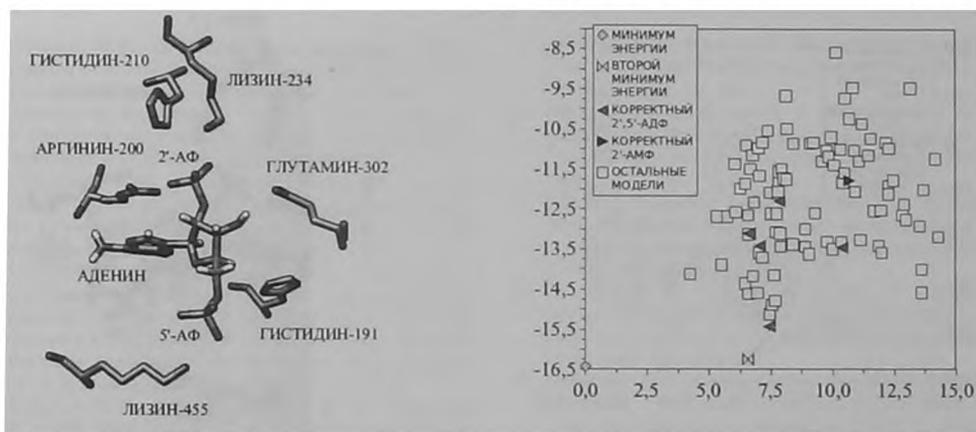


Рис. №7. Положение модели 2',5'-АДФ с минимальной энергией «MMFF94s» в КАТА.

Рис. №8. Зависимость энергии «AutoDock» моделей НАДФН2 от СКО от модели с минимальной энергией.

тамина-302 к аммонийной группе лизина-455 согласуется с отсутствием электронной плотности у амида глутамина-302, где расположен 5'-адениновый фосфат НАДФН2 из ЧЭК. Кроме того, свободное взаимодействие 5'-фосфата с аммонием лизина-455 значительно более продуктивно, чем с NH2-группой амида боковой цепи глутамина-302, экранированной амидным кислородом. Отклонение 5'-фосфата к HN глутамина-302 менее вероятно, так как соответствующие энергии (-516.423... -510.576 ккал/моль) выше, чем у моделей первой группы и части моделей с обратной, ошибочной, геометрией (-522.464... -487.462 ккал/моль). Адекватность отбора подтверждается тем, что модели, в которых оба фосфата удалены от правильного положения 2'-фосфата, включая модели в гемовом кармане, имеют худшие энергии (-49.488...63.331 ккал/моль). Поскольку энергия 2',5'-АДФ из ЧЭК в КАТА (-434.404 ккал/моль) намного выше минимальных значений, по «MMFF94s» эта конфигурация не реализуется, что соответствует кристаллографическим данным.

Модели НАДФН2 в КАТА расположены в экспери-

ментальном сайте (минимальное СКО от НАДФН2 из ЧЭК 1.969 Å). Найдено шесть моделей с 2'-АМФ в корректной позиции, в пяти из них 5'-адениновый фосфат находится вблизи NH3+ лизина-455, а в шестой - примерно по середине между NH3+ лизина-455 и амидом боковой цепи глутамина-302. Остальные модели распределены по сайту с расположением отдельных фрагментов около их позиций в НАДФН2 из ЧЭК.

В КАТА две модели НАДФН2 с минимальными энергиями «AutoDock» (-16.430 и -16.250, следующее значение -15.430 ккал/моль, рисунок №8) значительно отклоняются от НАДФН2 из ЧЭК (минимальное СКО 5.148 Å), от отобранных «AutoDock» моделей 2',5'-АДФ (минимальное СКО 8.322 Å) и друг от друга (СКО 6.555 Å). В первой модели (рисунок №9) 5'-АДФ свернут во-круг гуанидина аргинина-200, 2'-фосфат связан амидом глутамина-456 и гуанидином аргинина-200, а никотинамидная рибоза и никотинамид частично замещают друг друга в НАДФН2 из ЧЭК. Во второй модели (рисунок №10) аденин смещен к центру сайта связывания, адениновая рибоза - к амиду боковой цепи глутами-

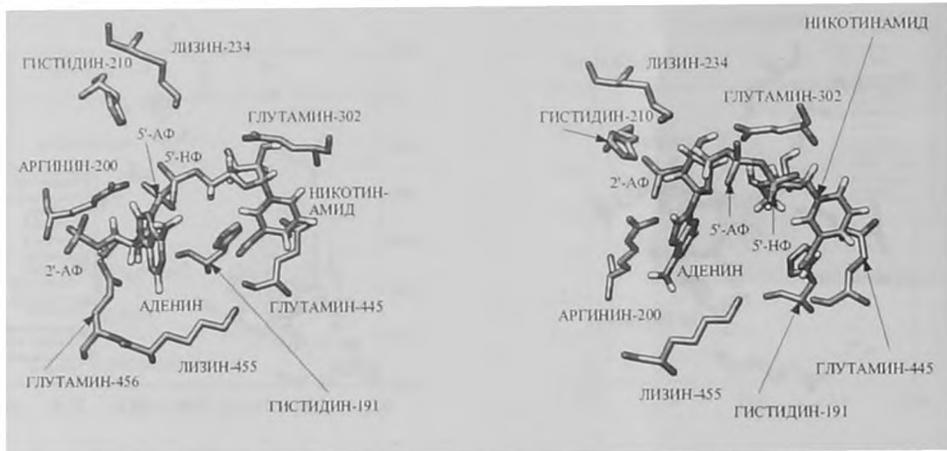


Рис. №9. Положение модели НАДФН2 с минимальной энергией «AutoDock» в КАТА.

Рис. №10. Положение модели НАДФН2 со второй минимальной энергией «AutoDock» в КАТА.

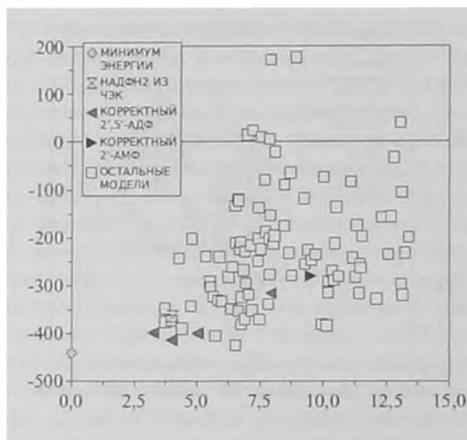


Рис. №11. Зависимость энергии «ММFF94s» моделей НАДФН2 от СКО от модели с минимальной энергией.

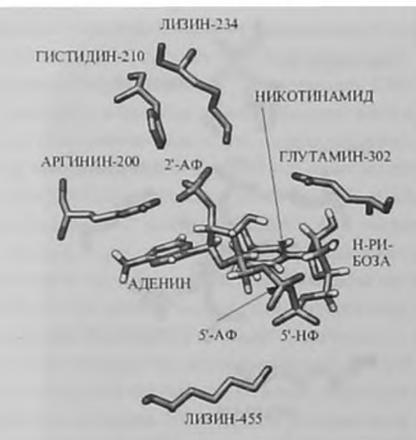


Рис. №12. Положение модели НАДФН2 с минимальной энергией «ММFF94s» в КАТА.

на-302, фосфаты лежат около фосфатов НАДФН2 из ЧЭК, а никотин-амидная рибоза и никотинамид близки к позициям друг друга в НАДФН2 из ЧЭК. Обе модели ошибочны, так как не соответствуют электронной плотности. Одна из моделей с корректным положением 2'-АМФ (5'-адениновый фосфат у NH3+ лизина-455) занимает третье место по энергии «AutoDock», а остальные пять значительно уступают другим моделям (-13.460...-11.790 ккал/моль). Та-ким образом, отбор моделей НАДФН2 в КАТА по энергии «AutoDock» не соответствует рентгеноструктурным данным.

Распределение моделей НАДФН2 в КАТА по энергии «ММFF94s» в зави-сисимости от СКО от модели с минимальной энергией представлено на рисунке №11. Модель с минимальной энергией (рисунок №12) обособлена от других по энергии (-441.418 ккал/моль, следующее значение -425.584 ккал/моль) и поло-жению (минимальное СКО 3.250 Å). Она также удалена от НАДФН2 из ЧЭК (СКО 4.035 Å), которая имеет заметно более высокую энергию (-364.679 ккал/моль). Однако 2',5'-АДФ минимальной модели НАДФН2 близок к мини-мальной по

«ММFF94s» модели 2',5'-АДФ (СКО 1.672 Å), пирофос-фат распо-ложен у NH3+ лизина-455, никотинамидная рибоза замещает 5'-никотинамид-ный фосфат НАДФН2 из ЧЭК, а никотинамид – никотинамидную рибозу. Сле-дующие пять мест по энергии «ММFF94s» занимают модели, в которых 2'-фос-фат находится в корректном поло-жении, пирофосфат взаимодействует с NH3+ лизина-455, а никотинамидрибозид расположен на открытых участках поверх-ности белка. Так, модели с корректной геометрией 2',5'-АДФ занимают третье, пятое и шестое места. Однако еще две модели с близким к минимальной распо-ложением 2',5'-АДФ и 2'-АМФ находятся соответственно на 30-м и 41-м местах. Анализ распределения 2',5'-АДФ из моделей НАДФН2 в КАТА по энергии «ММFF94s» в зависимости от СКО от минимальной по «ММFF94s» модели 2',5'-АДФ (данные не приведены) показал, что в модели, занимающей 30-е мес-то причиной большой потери энергии явля-ется неблагоприятное положение ни-котинамидрибозид-5'-монофосфата, а в модели с корректным положением толь-ко 2'-АМФ энергетически неблагоприятное положение занима-

ют как 5'-адениновый фосфат, так и никотинамидрибозид-5'-монофосфат. Таким образом, отбор моделей НАДФН2 в КАТА по энергии «MMFF94s» определяется схожим с другими каталазами размещением 2'-АМФ и локализацией пирофосфата у NH₃⁺ лизина-455. Поскольку эти результаты согласуются с данными рентгеноструктурного анализа и отбором по энергии «MMFF94s» моделей неорганических фосфатов и 2',5'-АДФ, лучшей по энергии «MMFF94s» модель комплекса НАДФН2 и КАТА может отражать близкую к реальности конфигурацию, по крайней мере, в части 2',5'-АДФ.

Заключение

Моделирование неорганических монофосфатов позволило корректно идентифицировать сайт связывания 2'-фосфата НАДФН2 в КАТА. Однако отбор моделей 2',5'-АДФ и НАДФН2 в КАТА по энергии

«AutoDock» противоречит экспериментальным данным. Применение «MMFF94s» позволило предложить обоснованную модель комплекса 2',5'-АДФ и КАТА. С помощью «MMFF94s» отобрана также модель комплекса НАДФН2 и КАТА с корректно определенным положением аденозин-2'-моно-,5'-дифосфата. Эти модели согласуются с рентгеноструктурными данными по комплексу НАДФН2 и КАТА, а также со структурой НАДФН2 и ее вариациями в комплексах с другими каталазами.

Авторы выражают признательность профессору Ульфу Райду (кафедра теоретической химии Стокгольмского университета, Швеция) за предоставленные заряды для НАДФН2 и других НАД(Ф)(Н) молекул и за доброжелательные комментарии и репринты статей по методике получения этих зарядов.■

Литература:

1. Kirkman H. N., Gaetani G. F. Catalase : a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984; 81: 4343-4347.
2. Jouve H. M., Beaumont F., Leger I., Foray J., Pelmont J. Tightly bound NADPHin Proteus mirabilis catalase. Biochem Cell. Biol. 1989; 67: 271-277.
3. Murshudov G. N., Grebenko A. I., Branning J. A. et al. The structures of Micrococcus lysodeikticus catalase, its ferryl intermediate (compound II) and NADPH complex. Acta Cryst. D. 2002; 58: 1972-1982.
4. Loewen P. C., Carpena X., Rovira C. et al. Structure of Helicobacter pylori catalase with and without formic acid bound at 1.6 Å resolution. Biochemistry. 2004; 43: 3089-3103.
5. Carpena X., Soriano M., Klotz M. G. et al. Structure of the clade 1 catalase, CatF of Pseudomonas syringae, at 1.8 Å resolution. Proteins. 2003; 50: 423-436.
6. Kirkman H. N., Rolfo M., Ferraris A. M., Gaetani G. F. (1999) Mechanisms of protection of catalase by NADPH. J. Biol. Chem. 1999; 274: 13908-13914.
7. Olson L. P., Bruce T. C. Electron tunneling and ab initio calculations related to the one-electron oxidation of NAD(P)H bound to catalase. Biochemistry. 1995; 34: 7335-7347.
8. Herzog C., Zamocky M., Nykyri L., Koller F. Function of NADPH in catalase A from Saccharomyces cerevisiae. Protein Sci. 1997; 6: 106.
9. Mate M. J., Zamocky M., Nykyri L. N. et al. Structure of Catalase A from Saccharomyces cerevisiae. J. Mol. Biol. 1999; 268: 135-149.
10. Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. J. Comp. Chem. 1998; 19: 1639-1662.
11. Buzko O. V., Bishop A. C., Shokat K. M. Modified AutoDock for accurate docking of protein kinase inhibitors. J. Comp.-Aid. Mol. Des. 2002; 16: 113-127.
12. Coutinho M. P., Dowd M. K., Reilly P. J. Automated docking of mono-saccharide substrates and analogues and methyl- α -carboxinoside in the gluco-amylase active site. Proteins : Struct., Func., Gen. 1997; 27: 235-248.
13. Егоров Д. А., Савельев Л. И., Цвиренко С. В. Компьютерное моделирование сложных лиганд-рецепторных взаимодействий. Вест. мед. акад. науки. 2006; 2: 9-14.
14. Halgren T. A. MMFF VII Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular-interaction energies and geometries. J. Comp. Chem. 1999; 20(7): 730-748.
15. Berman H.M., Henrick K., Nakamura H. Announcing the world-wide Protein Data Bank. Nature Structural Biology. 2003; 10: 980.
16. Bernstein F.C., Koetzle T. F., Williams G. J. B. et al. The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. J. Mol. Biol. 1977; 112: 535-542.
17. Word J. M., Lovell S. C., Richardson J. S., Richardson D. C. Asparagine and glutamine : using hydrogen atom contacts in the choice of side chain amide orientation. J. Mol. Biol. 1999; 285: 1735-1747.
18. Putnam C. D., Arvai A. S., Bourne Y., Tainer J. A. Active and inhibited human catalase structures : ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. J. Mol. Biol. 2000; 296: 295-309.
19. Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C. et al. UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. J. Comp. Chem. 2004; 25: 1605-1612.
20. Ihlenfeldt W. D., Takahashi Y., Abe H., Sasaki S. Computation and Management of Chemical Properties in CACTVS: An extensible Net-worked Approach toward Modularity and Flexibility. J. Chem. Inf. Comp. Sci. 1994; 34: 109-116.
21. Vainio M. J., Johnson M. S. Generating conformer ensembles using a multiobjective genetic algorithm. J. Chem. Inf. Model. 2007; 47: 2462-2474.
22. Schmidt M. W., Baldrige K. K., Boatz J. A. et al. General atomic and molecular electronic structure system. J. Comp. Chem. 1993; 14: 1347-1363.
23. Gordon M. S., Schmidt M. W. Advances in electronic structure theory : GAMESS a decade later. In Dykstra C. E., Frenking G., Kim K. S., Scuseria G. E., editors. Theory and applications of computational chemistry : the first forty years. Amsterdam: Elsevier; 2005, pp. 1167-1189.
24. Bayl C. I., Cieplak P., Cornell W. D., Kollman P. A. A well-begaved electro-static potential based method using charge restraints for deriving atomic charges : the RESP model. J. Phys. Chem. 1993; 97: 10269-10280.
25. Sigfridsson E., Ryde U. Comparison of methods for deriving atomic charges from the electrostatic potential and moments. J. Comput. Chem. 1998; 19: 377-395.
26. Sanner M. F. Python : a programming language for software integration and development. J. Mol. Graphics Mod. 1999; 17: 57-61.
27. Gouet P., Jouve H.-M., Dideberg O. Crystal structure of Proteus mirabilis PR catalase with and without bound NADPH. J. Mol. Biol. 1995; 249: 933-954.