

## ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СТАБИЛЬНОСТЬ КЛАСТЕРА-ПРЕКУРСОРА КРИСТАЛЛА ТЕРМОЛИЗИНА

© 2024 г. Ю. В. Кордонская<sup>1,\*</sup>, В. И. Тимофеев<sup>2</sup>, М. А. Марченкова<sup>2,3</sup>, Ю. В. Писаревский<sup>2</sup>, С. Ю. Сильвестрова<sup>4</sup>, Ю. А. Дьякова<sup>1</sup>, М. В. Ковальчук<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова Курчатовского комплекса кристаллографии и фотоники НИИ “Курчатовский институт”, Москва, Россия

<sup>3</sup>Международный исследовательский институт интеллектуальных материалов Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия

<sup>4</sup>Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова, Москва, Россия

\*E-mail: yukord@mail.ru

Поступила в редакцию 25.03.2024 г.

После доработки 25.03.2024 г.

Принята к публикации 30.03.2024 г.

С помощью метода молекулярной динамики проведена оценка стабильности кластера-прекурсора (гексамера) кристалла термолизина в широком диапазоне температур (10–90°C). Результаты моделирования показали, что с увеличением температуры стабильность гексамера в целом снижается, однако гексамер не распадается ни при одной из рассмотренных температур. При 60°C обнаружено повышение стабильности гексамера. Это значение близко к температуре максимальной ферментативной активности термолизина (70°C). Исходя из анализа результатов предположено, что кристаллизацию термолизина возможно провести при 60°C.

DOI: 10.31857/S0023476124040165, EDN: XBSOKY

### ВВЕДЕНИЕ

Функционирование белков в значительной степени зависит от их пространственной структуры, чаще всего определяемой с помощью рентгеноструктурного анализа. Для использования этого метода необходимо сначала вырастить кристалл исследуемого белка. Однако поиск оптимальных условий кристаллизации белков остается сложным и времяемким этапом, который до сих пор проводится эмпирически: путем перебора большого количества условий. Тем не менее в [1] установлено, что кристаллизации белков предшествует образование кластеров-прекурсоров, а именно: трехмерных фрагментов кристаллической структуры. Было показано, что условия кристаллизации (температура, концентрации белка и осадителя) определяют образование кластеров и их концентрацию. Изучение взаимодействия белков в кластерах-прекурсорах может быть полезно и для исследования функционирования белков, например ферментов. Как известно, в основе функционирования белков лежат конформационные ансамбли [2], свойства которых в значительной степени зависят от температуры.

В [3] обнаружено, что кластеры-прекурсоры (димеры) кристалла протеиназы К, температурный

оптимум активности которой равен 60°C, ведут себя аномально, резко и немонотонно изменяя стабильность при повышении температуры выше 60°C. Также предполагалось, что протеиназа К может кристаллизоваться при относительно высоких для белков температурах около 50°C. В [2] дифракционный набор от кристаллов протеиназы К был собран в диапазоне температур от 40 до 90°C.

В данной работе с использованием метода молекулярной динамики (МД) изучена стабильность кластера-прекурсора кристалла другой термофильной протеиназы, термолизина, при различных температурах от 10 до 90°C, включая температуру максимальной активности фермента, которая составляет 70°C.

Недавние исследования с использованием метода малоуглового рассеяния рентгеновских лучей подтвердили, что кластеры-прекурсоры, образующиеся в процессе кристаллизации термолизина, представляют собой гексамеры [4]. Кроме того, с помощью метода МД установлен наиболее стабильный тип гексамера, являющийся кластером-прекурсором [5].

Термолизин представляет собой металлопротеиназу, вырабатываемую бактерией *Bacillus*

*thermoproteolyticus*. Этот белок катализирует гидролиз пептидных связей в белках и широко используется для картирования пептидов и производства пептидных фрагментов для структурных и функциональных исследований. Термолизин известен своей стабильностью и активностью при высоких температурах [6]. Каталитическая активность термолизина максимальна в диапазоне pH 7.0–9.0 при температуре 70°C [7]. Пространственная структура содержит два домена с активным центром между ними. В активный центр термолизина (PDB ID: 3DNZ) входят остатки: GLU-142, HIS-143, HIS-146 и GLU-166, координирующие ион цинка [8].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Модели гексамеров подготовлены в соответствии с методикой, описанной в [3]. С использованием кристаллической структуры гексагональных кристаллов термолизина (PDB ID: 3DNZ, пр. гр.  $P6_322$ ) создана молекулярная модель потенциальных единиц роста этих кристаллов. С помощью программы PyMOL (версия 1.8 [9]) с использованием операторов симметрии пр. гр.  $P6_322$  воссоздан фрагмент кристаллической структуры термолизина, из которого выделен гексамер. Ионы осадителя, связанные с кристаллом термолизина, сохранены в структуре гексамера (четыре иона кальция и один цинка на одну молекулу белка), в то время как молекулы воды были удалены из структурного файла.

Для определения состояний протонирования аминокислотных остатков при pH 6.0 (согласно pH кристаллизационного буфера для кристалла с PDB ID: 3DNZ) использовали сервер PROPKA (версия 3.4.1 [10]). Все вычисления проводили с помощью пакета GROMACS версии 2021 [11]. Для МД-моделирования применяли силовое поле Amber ff99SB-ILDN [12], в котором улучшены торсионные потенциалы для некоторых атомных групп.

Каждый гексамер помещался в центр кубической ячейки моделирования с периодическими граничными условиями. Минимальное расстояние от грани ячейки до атома белка составляло 1 нм. Ячейки заполнялись 4-сайтовой моделью воды TIP4P-Ew, разработанной для применения методов суммирования по Эвальду [13]. Концентрация осадителя сульфата аммония в растворе составляла 0.75 М, как в условиях кристаллизации. Трехмерная структура иона  $\text{NH}_4^+$  получена из PDBChem (код: NH4, [14]), а иона  $\text{SO}_4^{2-}$  – с помощью модуля PLMD (Peptide Ligand Molecular Dynamics) из пакета MDAAnalysis [15, 16]. Топологии ионов сгенерированы с помощью программы Antechamber [17]. Для нейтрализации суммарного заряда ячейки в раствор добавлялось 36 ионов  $\text{Cl}^-$ , так как это необходимо для применения алгоритма PME при расчете дальнедействующих электростатических взаимодействий [18].

Перед проведением вычислений продуктивной МД моделируемые системы подвергали минимизации энергии методом наискорейшего спуска (50000 шагов) до тех пор, пока максимальная сила, приходящаяся на один атом, становилась меньше 1000 кДж/(М·нм). После этого ячейки уравнивались в течение 100 пс с использованием модифицированного термостата Берендсена (V-rescale) [19] в ансамбле NVT и уравнивались в течение 100 пс с использованием баростата Парринелло–Рамана [20] в ансамбле NPT. Расчеты продуктивной МД осуществляли в ансамбле NPT с термостатом “V-rescale” и баростатом Парринелло–Рамана. Интегрирование уравнений движения проводили по стандартному алгоритму “leap-frog” [21] с шагом 2 фс. Нековалентные взаимодействия учитывали в сфере действия 1 нм. Дальнедействующие электростатические взаимодействия рассчитывали методом “частица–сетка” Эвальда (PME, [17]) с кубической интерполяцией и шагом сетки в обратном пространстве 0.16 нм. Длины связей гексамеров фиксировали алгоритмом LINCS [21].

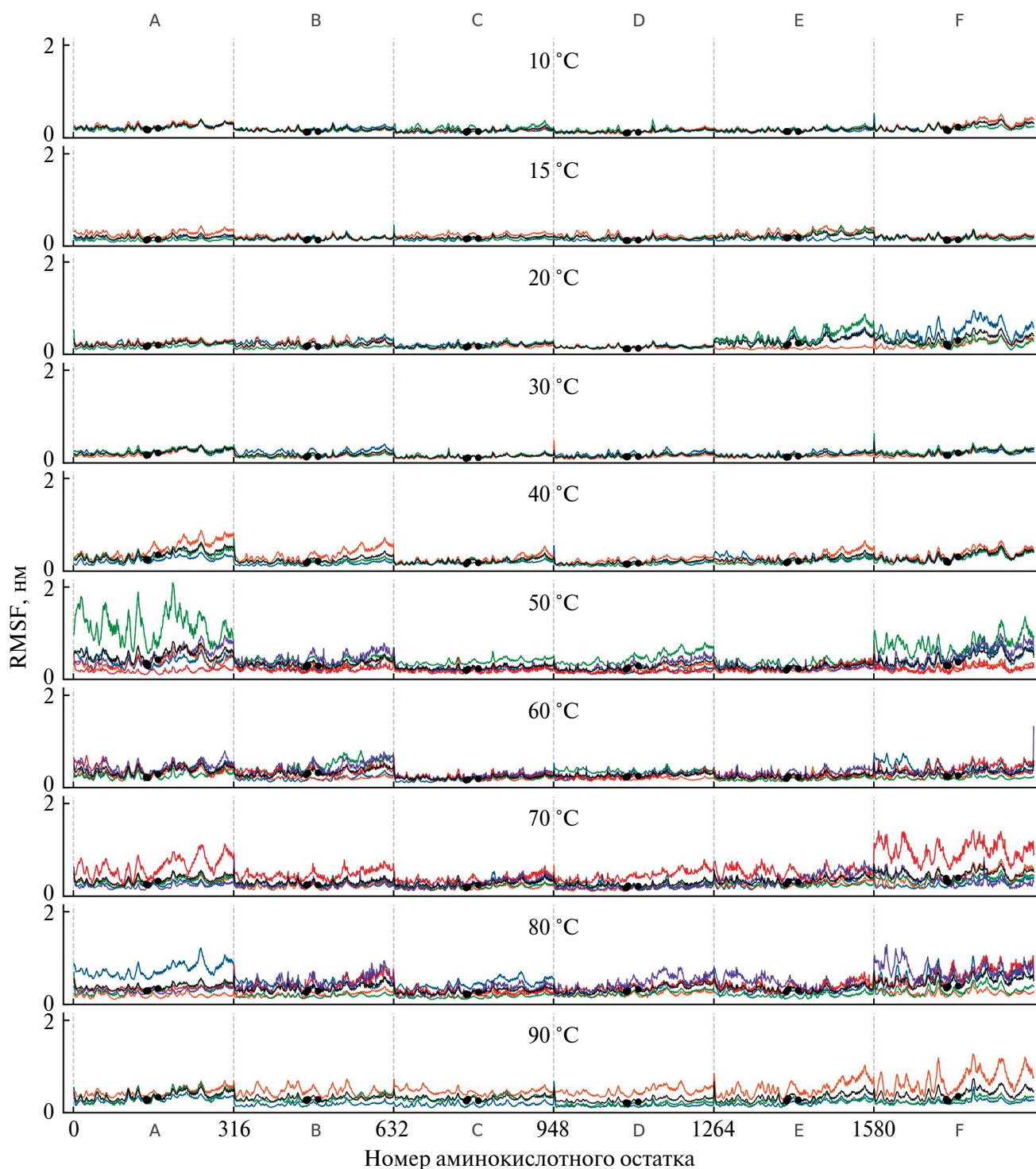
Продолжительность каждой рассчитанной траектории составила 100 нс. Молекулярную динамику гексамеров моделировали при 10 температурах: от 10 до 90°C с шагом 10°C, а также при 15°C. Для каждой температуры в диапазоне 10–40°C и 90°C провели по три независимых моделирования. Для температур от 50 до 80°C количество независимых моделирований было увеличено до пяти.

Для структурного выравнивания по начальному положению атомов термолизина использовали команду *gmx trjconv*. Значения RMSF (среднеквадратичные флуктуации) вычисляли только для атомов  $\text{C}_\alpha$  с помощью команды *gmx rmsf*. Значения RMSF сначала усредняли (с вычислением погрешности на основании несмещенной оценки дисперсии) для каждой температуры по независимым моделированиям (трем или пяти в зависимости от температуры); затем значения RMSF и погрешности (стандартные отклонения) дополнительно усредняли по всем атомам  $\text{C}_\alpha$ .

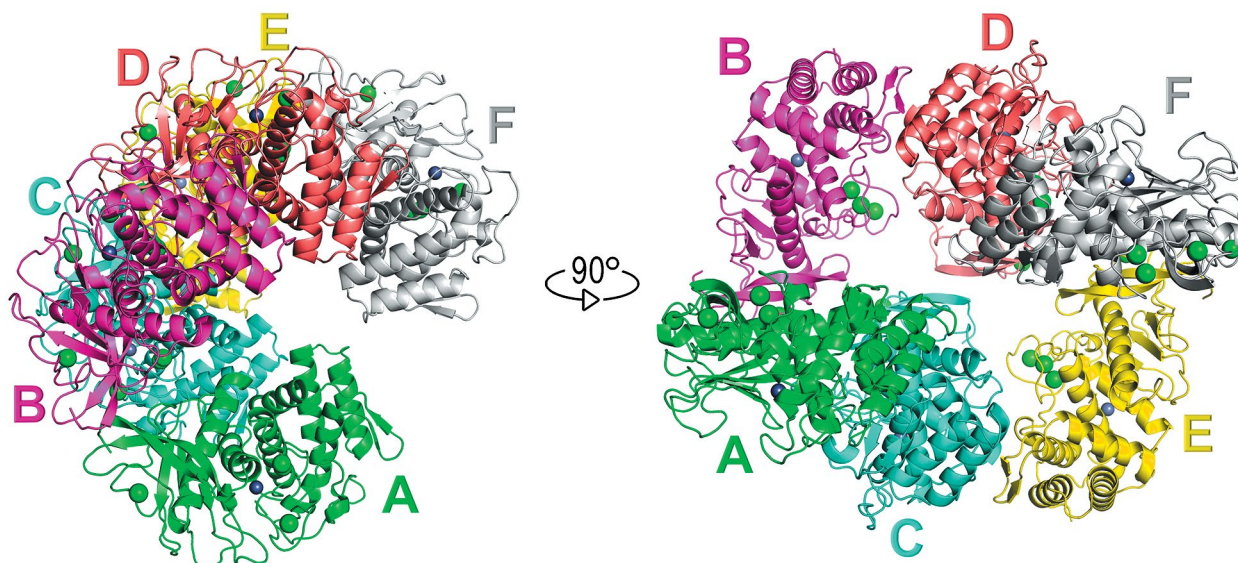
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Значения RMSF атомов  $\text{C}_\alpha$  характеризуют гибкость полипептидной цепи, так как они показывают, насколько каждый из данных атомов отклоняется от своего среднего (за время моделирования) положения. Высокие значения RMSF и большой разброс этих значений говорят о неустойчивости гексамера. По данным моделирования построили графики RMSF атомов  $\text{C}_\alpha$  для всех исследуемых гексамеров термолизина, находящихся при температурах от 10 до 90°C.

На рис. 1 цветными кривыми представлены графики RMSF атомов  $\text{C}_\alpha$  для всех моделирований



**Рис. 1.** Значения RMSF кластера-прекурсора (гексамера) кристалла термолизина в кристаллизационном растворе при температурах в диапазоне от 10–90°C. Каждая цветная кривая соответствует одному моделированию, черная — значениям RMSF, усредненным по всем независимым моделированиям (трем или пяти) при определенной температуре.

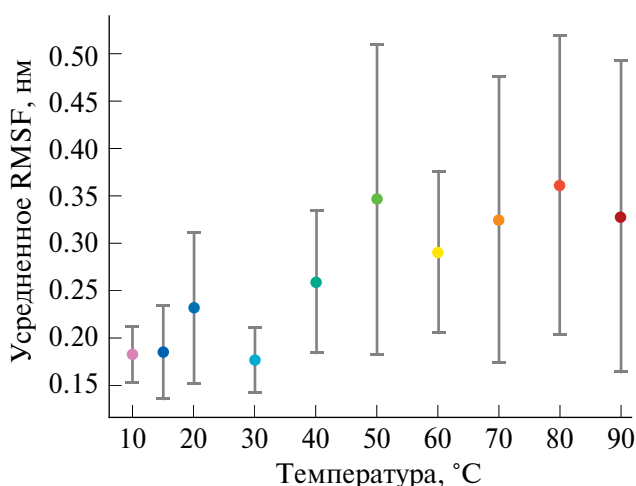


**Рис. 2.** Кластер-прекурсор (гексамер) кристалла термолизина в двух проекциях. Буквами А–F обозначены мономеры, составляющие гексамер. Зелеными сферами показаны ионы кальция, серыми – цинка.

в одном масштабе, а черными кривыми – RMSF, усредненным по всем независимым моделированиям (трем для 10–40°C и 90°C; или пяти для 50–80°C) для каждой конкретной температуры. Из рис. 1 следует, что в среднем мономеры А и F наиболее нестабильны, а мономеры С и D, наоборот, самые устойчивые. Это объясняется тем, что, как видно из рис. 2, мономеры А и F имеют наименьшую площадь контактов с остальными мономерами, а мономеры С и D, наоборот, находятся “в глубине” гексамера.

Черными маркерами на рис. 1 показаны усредненные (по моделированиям) RMSF атомов  $C_{\alpha}$ , входящих в активный центр термолизина. Согласно рис. 1, атомы активного центра наиболее стабильны относительно ближайших к ним атомов, так как RMSF активного центра принимает наименьшие значения в его окрестности. Это позволяет предположить, что термолизин может выполнять свою каталитическую функцию даже в составе кластера-прекурсора как при низких, так и относительно высоких температурах (по крайней мере, до 90°C).

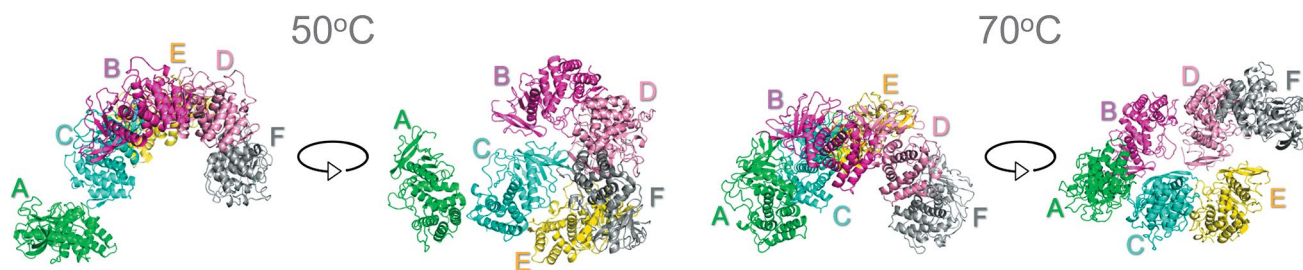
Результаты дополнительного усреднения RMSF и погрешностей (стандартных отклонений) по всем атомам  $C_{\alpha}$  представлены на рис. 3. Из рис. 1 и 3 видно, что с увеличением температуры стабильность гексамера в среднем снижается. Однако даже при значительной подвижности кластера-прекурсора при высоких температурах анализ всех смоделированных траекторий показал, что гексамер всегда остается целым: в ходе динамики любой мономер остается связанным с остальным гексамером. Согласно рис. 1 наибольшие трансформации



**Рис. 3.** Значения RMSF, усредненные по всем атомам  $C_{\alpha}$  кластера-прекурсора кристалла термолизина в кристаллизационном растворе при различных температурах (от 10 до 90°C). Указанные погрешности составляют одно стандартное отклонение при усреднении RMSF по независимым моделированиям.

структуры гексамера наблюдаются в одном из моделирований при 50°C (соответствует зеленой кривой на рис. 1). Следующий по нестабильности гексамер был смоделирован при 70°C (соответствует красной кривой на рис. 1). Последние фреймы траекторий движения данных гексамеров (структуры после 100 нс динамики) приведены на рис. 4, из которого следует, что ни одна молекула не успела отделиться от гексамера за 100 нс. Вероятно, при





**Рис. 4.** Наименее стабильные гексамеры в конце моделирования (100 нс) в двух проекциях при 50 (слева) и 70°C (справа). Молекулы термолизина не отрываются от гексамера даже в ходе МД самых неустойчивых структур.

50°C мономер А, обладающий самыми высокими показателями RMSF на рис. 1, потеряет оставшиеся межмолекулярные связи в ближайшее время. Тем не менее это единственный из 38 моделированных случаев, в котором наблюдается тенденция к отрыву хотя бы одного мономера. Из рис. 4 видно, что уже у второго по нестабильности гексамера (при 70°C) все мономеры имеют достаточно большую площадь межмолекулярных контактов. Кроме того, в реальном кристаллизационном растворе небольшая часть гексамеров скорее всего тоже распадается.

Целостность кластера-прекурсора кристалла термолизина в диапазоне 10–90°C позволяет сделать предположение о том, что его кристаллизация может быть проведена при высоких температурах (до 90°C).

Интересно отметить, что при температуре 60°C, близкой к температуре пика активности термолизина (70°C [7]), разброс значений RMSF вокруг среднего минимален в диапазоне температур от 50 до 90°C (рис. 3). Диапазон значений RMSF при 60°C почти в 2 раза уже, чем для температур 50, 70, 80 и 90°C. Узкий разброс значений RMSF при 60°C указывает на то, что степень стабильности белка при данной температуре сохраняется немного лучше (для пяти независимых моделированных), чем при остальных температурах в диапазоне 50–90°C. Это может свидетельствовать о повышенной воспроизводимости моделирования при температуре, близкой к максимуму ферментативной активности термолизина, т.е. о лучшей предсказуемости поведения белка при этой температуре. Кроме того, согласно [3] для другой протеазы, протеиназы К, не только абсолютное значение RMSF оставалось относительно низким, но и диапазон его значений был достаточно узким именно при температуре максимальной ферментативной активности протеиназы К. Это указывает на возможное общее свойство протеаз, заключающееся в относительной стабильности кластеров-прекурсоров их кристаллов при температурах, близких к пику их активности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом МД исследовано влияние температуры (от 10 до 90°C) на стабильность кластера-прекурсора кристалла термолизина. Установлено, что с увеличением температуры стабильность гексамера в среднем снижается, однако его целостность сохраняется. Замечено, что при температуре 60°C, близкой к температуре пика активности термолизина (70°C), разброс значений RMSF вокруг среднего минимален в диапазоне от 50 до 90°C. Это позволяет предположить, что кристаллизация термолизина может быть проведена при 60°C, так как при этой температуре кластеры-прекурсоры достаточно стабильны.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ “Курчатовский институт” и при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по гранту № 075-15-2021-1363 (продолжение).

Работа была выполнена с использованием оборудования центра коллективного пользования “Комплекс моделирования и обработки данных исследовательских установок мега-класса” НИЦ “Курчатовский институт”, <http://ckp.nrcki.ru/>.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marchenkova M.A., Boikova A.S., Ilina K.B. et al. // *Acta Naturae*. 2023. V. 15. № 1. P. 58. <https://doi.org/10.32607/ACTANATURAE.11815>
2. Du S., Wankowicz S.A., Yabukarski F. et al. // *bioRxiv*. 2023. <https://doi.org/10.1101/2023.05.05.539620>
3. Kordonskaya Y.V., Timofeev V.I., Dyakova Y.A. et al. // *Crystals*. 2022. V. 12. № 11. P. 1645. <https://doi.org/10.3390/CRYST12111645>
4. Kovalchuk M.V., Boikova A.S., Dyakova Y.A. et al. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2019. V. 37. № 12. P. 3058. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1507839>
5. Kordonskaya Y.V., Timofeev V.I., Dyakova Y.A. et al. // *Mend. Commun.* 2023. V. 33. № 2. P. 225. <https://doi.org/10.1016/J.MENCOM.2023.02.024>

6. *van den Burg B., Eijssink V.* // Handbook of Proteolytic Enzymes. 2013. V. 1. P. 540.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00111-3>
7. *Lam M.P.Y., Lau E., Liu X. et al.* // Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists. 2012. P. 307.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00085-5>
8. *Adekoya O.A., Sylte I.* // Chem. Biol. Drug. Des. 2009. V. 73. № 1. P. 7.  
<https://doi.org/10.1111/J.1747-0285.2008.00757.X>
9. *DeLano W.L.* // The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8; Schrödinger, LLC: New York, NY, USA, 2015.
10. *Jurrus E., Engel D., Star K. et al.* // Protein Sci. 2018. V. 27. № 1. P. 112.  
<https://doi.org/10.1002/PRO.3280>
11. *Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B. et al.* // J. Comput. Chem. 2005. V. 26. № 16. P. 1701.  
<https://doi.org/10.1002/jcc.20291>
12. *Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K. et al.* // Proteins: Structure, Function and Bioinformatics. 2010. V. 78. № 8. P. 1950.  
<https://doi.org/10.1002/prot.22711>
13. *Horn H.W., Swope W.C., Pitner J.W. et al.* // J. Chem. Phys. 2004. V. 120. № 20. P. 9665.  
<https://doi.org/10.1063/1.1683075>
14. *Dimitropoulos D., Ionides J., Henrick K.* // Curr. Protoc. Bioinf. 2006. P. 14.3.1–14.3.3.
15. *Michaud-Agrawal N., Denning E.J., Woolf T.B., Beckstein O.* // J. Comput. Chem. 2011. V. 32. № 10. P. 2319.  
<https://doi.org/10.1002/JCC.21787>
16. *Gowers R.J., Linke M., Barnoud J. et al.* // 15th Python in Science Conference, Los Alamos, NM (United States), Sep 11. 2016. P. 98.  
<https://doi.org/10.25080/Majora629e541a-00e>
17. *Sousa Da Silva A.W., Vranken W.F.* // BMC Res Notes. 2012. V. 5. № 1. P. 1.  
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-367/FIGURES/3>
18. *Essmann U., Perera L., Berkowitz M.L. et al.* // J. Chem. Phys. 1995. V. 103. P. 8577.  
<https://doi.org/10.1063/1.470117>
19. *Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., Van Gunsteren W.F. et al.* // J. Chem. Phys. 1984. V. 81. № 8. P. 3684.  
<https://doi.org/10.1063/1.448118>
20. *Parrinello M., Rahman A.* // J. Chem. Phys. 1982. V. 76. № 5. P. 2662.  
<https://doi.org/10.1063/1.443248>
21. *Van Gunsteren W.F., Berendsen H.J.C.* // Mol. Simul. 1988. V. 1. № 3. P. 173.  
<https://doi.org/10.1080/08927028808080941>
22. *Hess B., Bekker H., Berendsen H.J.C., Fraaije J.G.E.M.* // J. Comput. Chem. 1997. V. 18. P. 1463.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H)

## TEMPERATURE INFLUENCE ON THE STABILITY OF THE PRECURSOR CLUSTER OF THE THERMOLYSIN CRYSTAL

Y. V. Kordonskaya<sup>a,\*</sup>, V. I. Timofeev<sup>b</sup>, M. A. Marchenkova<sup>b,c</sup>, Y. V. Pisarevsky<sup>b</sup>,  
S. Yu. Silvestrova<sup>d</sup>, Y. A. Dyakova<sup>a</sup>, M. V. Kovalchuk<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>National Research Centre “Kurchatov Institute,” 1, Akademika Kurchatova pl., 123182 Moscow, Russia

<sup>b</sup>Shubnikov Institute of Crystallography of Kurchatov Complex of Crystallography and Photonics of NRC “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

<sup>c</sup>The Smart Materials Research Institute, Southern Federal University,  
st. Andrey Sladkova 178/24, 344090 Rostov-on-Don, Russia

<sup>d</sup>The Loginov Moscow Clinical Scientific Center Moscow Health Department,  
Shosse Entusiastov 84/1, 111123 Moscow, Russia

\*e-mail: yukord@mail.ru

**Abstract.** We used the molecular dynamics method to assess the stability of the precursor-cluster (hexamer) of thermolysin crystal over a wide range of temperatures (10–90°C). The simulation results showed that as the temperature increases, the stability of the hexamer, in general, decreases, however, the hexamer does not dissociate at any of the considered temperatures. At a temperature of 60°C, an increase in the stability of the hexamer was observed. This value is close to the temperature of maximum enzymatic activity of thermolysin (70°C). Based on the analysis of the results, it was assumed that the crystallization of thermolysin could be carried out at 60°C.