

УДК 577.322.63

## МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОЛНОЙ СТРУКТУРЫ ТРЕХДОМЕННОЙ МОНООКСИГЕНАЗЫ СYP102A1 BM3 ИЗ *BACILLUS MEGATERIUM*

А.В. Кривицкая<sup>1,3</sup>, А.А. Пометун<sup>2,3,4\*</sup>, П.Д. Паршин<sup>2,4</sup>, М.Г. Хренова<sup>2,3</sup>,  
В.Б. Урлахер<sup>5</sup>, В.И. Тишков<sup>2,3,4</sup>

(<sup>1</sup>Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева; <sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; <sup>3</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; <sup>4</sup>ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; <sup>5</sup>Дюссельдорфский университет им. Генриха Гейне, Институт биохимии; \*e-mail: aapometun@gmail.com, vitishkov@gmail.com)

Методами молекулярного моделирования получена пространственная структура полноразмерной монооксигеназы СYP102A1 из *Bacillus megaterium* (P450 BM3). В качестве исходных для моделирования использовали известные кристаллические структуры отдельного FAD-связывающего домена (PDB ID : 4DQK) и комплекса FMN-содержащего и монооксигеназного доменов (PDB ID : 1BVY). Молекулярное моделирование проводили путем анализа поверхностей исходных структур для нахождения ориентации, обеспечивающей максимальное число контактов редуцтазного FAD-содержащего домена и комплекса из редуцтазного FMN-содержащего и монооксигеназного гем-содержащего доменов. Полученную промежуточную структуру оптимизировали с помощью методов молекулярной динамики и молекулярной механики. Анализ финальной модельной полноатомной структуры свидетельствует о возможности достаточно сильного взаимодействия между FAD- и FMN-связывающими доменами, благодаря 10 водородным связям и трем гидрофобным взаимодействиям между аминокислотными остатками доменов в области их контакта. Полноатомная модель одноцепочечного трехдоменного цитохрома P450 BM3 может быть использована для исследования взаимосвязи структура-функция и белковой инженерии этого фермента.

**Ключевые слова:** цитохром P450 BM3, молекулярное моделирование, пространственная структура.

Монооксигеназа СYP102A1 из грамположительной капустной палочки *Bacillus megaterium* (цитохром P450 BM3) – важный для биотехнологии фермент, открытый еще в 1980-е годы. Этот фермент катализирует гидрокселирование жирных кислот с длиной цепи от 12 до 20 атомов углерода и обычно представляет собой гомодимер каждая из цепей которого состоит из 1048 аминокислотных остатков [1]. Повышенный интерес к P450 BM3 обусловлен сразу несколькими факторами. Во-первых, по сравнению с другими представителями этого семейства, он обладает более высокой каталитической константой, а также высокой стереоселективностью. Процесс окисления арахидоновой кислоты протекает с каталитической константой  $k_{\text{кат.}} = 280 \text{ с}^{-1}$  [1], значительно более высокой, чем у любого другого известного цитохрома P450. Во-вторых, СYP102A1 – фермент уникальный, состоящий из трех доменов: гем-содержащей монооксигеназы и двухдомен-

ной FMN- и FAD-содержащей редуцтазы, которая за счет окисления NADPH обеспечивает монооксигеназный домен электронами. Особенность P450 BM3 состоит в том, что все три домена объединены в одну полипептидную цепь, и это выделяет его среди остальных цитохромов P450. Схожесть этого фермента с эукариотическими ортологами делает его удобным модельным объектом для изучения большой группы физиологически и практически важных ферментов группы цитохромов P450 [2].

Многочисленные эксперименты различных авторов по кристаллизации P450 BM3 так и не увенчались успехом, вследствие чего к настоящему моменту структура полноразмерного фермента так и не определена. Невозможность получить необходимые кристаллы объясняют общей высокой гибкостью полипептидной цепи и низкой стабильностью междоменных линкеров. В настоящее время в Protein Data Bank (PDB)

имеется информация о 79 структурах отдельного монооксигеназного домена фермента, а также одна структура комплекса монооксигеназного и FMN-содержащего доменов (PDB ID : 1BVY). Кроме того, в PDB есть структура отдельного редуктазного домена P450 BM3, содержащего FAD (PDB ID : 4DQK). Чтобы правильно выбрать аминокислотные остатки для мутагенеза и получить гибридные структуры, необходимо установить пространственную структуру всего мультидоменного цитохрома P450 BM3. Поэтому в данной работе нами было проведено молекулярное моделирование трехмерной полноатомной структуры этого фермента.

### Экспериментальная часть

Начальный докинг домена FAD и комплекса доменов FMN и BM3 проводили с помощью пакета программ Accelrys Discovery Studio 2019. В качестве исходных использовали известные структуры отдельного FAD-содержащего домена (PDB ID: 4DQK) и комплекса из двух других доменов: гем-содержащего монооксигеназного и FMN-содержащего доменов (PDB ID : 1BVY). Дальнейшую оптимизацию структуры проводили на суперкомпьютере «Ломоносов-2» с использованием пакетов программ, указанных в разделе «Результаты и их обсуждение».

Для проведения анализа полученной модельной структуры использовали пакет программ Accelrys Discovery Studio Visualizer 2019. Этот же пакет применяли для получения изображений белковой глобулы.

### Результаты и их обсуждение

#### Особенности структуры отдельных доменов и механизма действия цитохрома P450 BM3.

Полипептидная цепь полноразмерного цитохрома P450 BM3 содержит в общей сложности 1048 аминокислотных остатков и состоит из трех структурных доменов: монооксигеназный гем-содержащий домен BM3 (остатки 1–470), домен FMN (остатки 471–664), содержащий флавинонуклеотид, и домен FAD (остатки 665–1048), который включает в свою структуру второй кофактор флавинадениндуклеотид (FAD) [1]. Реакция, которую катализирует P450 BM3, имеет сложный механизм и протекает в несколько этапов. На первом этапе в домене FAD происходит восстановление кофактора за счет переноса гидрид-иона с восстановленного кофермента NADPH на изоаллоксазиновую часть FAD. Далее идет междоменный перенос двух электронов с восстановленного FAD на другой флавиновый кофактор FMN. Восстановленный FMN выступает промежуточным донором электронов для гема [3]. В «классических» бактериальных цитохромах P450 все три домена существуют в виде отдельных субъединиц, а в P450 BM3 они объединены в единую полипептидную цепочку. Комплекс FMN и FAD известен как дифлавино-редуктазная часть фермента и напоминает дифлавиновую цитохром P450-редуктазу из эукариотических организмов [4].

Кофактор FAD связан в структуре соответствующего редуктазного домена за счет множественных взаимодействий с окружающими его

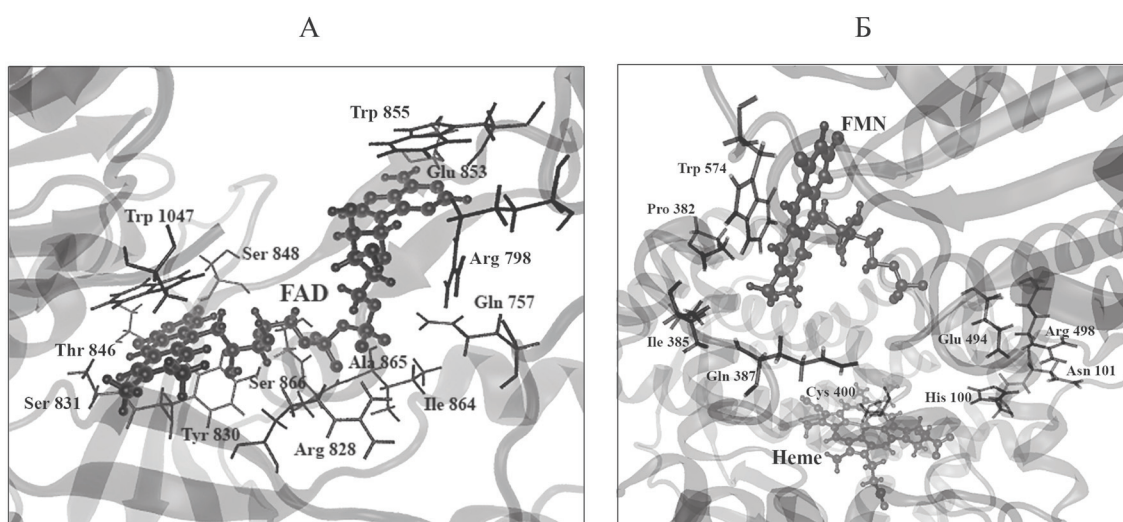


Рис. 1. Структура: А – FAD-связывающего домена, Б – комплекса из монооксигеназного и FMN-связывающего доменов P450 BM3 (при создании рисунков 1, А и 1, Б использовали структуры PDB 4DQK и PDB 1BVY соответственно)

аминокислотными остатками (рис. 1, А). Остатки Tyr830, Ser831, Ser848, Trp855, Ile864, Ala865, Ser866, Tyr974, Arg967 и Lys973 образуют с кофактором водородные связи. Водородные связи имеются также между пирофосфатными атомами кислорода FAD и остатками Arg828, Tyr829 и Glu860. Стэкинг- взаимодействия Trp855 с адениновой группой FAD и Trp1047 с изоаллоксазиновым кольцом дополнительно фиксируют молекулу кофактора в открытой конформации. Петля из аминокислотных остатков 729–743 сильно заряжена, что свидетельствует о ее потенциальном участии в междоменном взаимодействии (рис. 1, А). Вероятно, кофакторы FAD и FMN располагаются на расстоянии всего 4 Å друг от друга, что свидетельствует о возможности прямого переноса электронов между ними [3].

Монооксигеназный домен ВМЗ содержит Fe-протопорфирин IX (гем) с ионом Fe(III), координированным с атомом серы остатка Cys400. Область активного центра фермента над Fe-протопорфирином IX очень близка к нему. Она заряжена положительно, что играет важную роль для окислительно-восстановительного взаимодействия [5–8]. Изоаллоксазиновое кольцо FMN практически перпендикулярно плоскости гема и находится на границе раздела FMN- и FAD-связывающего доменов, большая его часть обращена наружу и экранирована растворителем, что свидетельствует об отсутствии сильных взаимодействий между доменами FMN и ВМЗ [6]. Аминокислотные остатки Pro382, Ile385 и Gln387 находятся на довольно близком расстоянии от FMN (4,0; 4,1 и 4,1 Å от его 7-метильной группы). Между Thr574 и изоаллоксазиновым кольцом FMN наблюдается стэкинг-взаимодействие. Таким образом, суммарно остатки Thr574, Pro382, Ile385, Gln387 и Cys400 образуют туннель передачи электронов от FMN к гему (FMN и гем находятся на расстоянии 18,4 Å друг от друга) [9]. Также стоит отметить водородные связи в парах Glu494 – His100 и Arg498 – Asn101, которые дополнительно стабилизируют структуры относительно друг друга (рис. 1, Б).

#### **Моделирование полной структуры P450 ВМЗ.**

Начальный этап для моделирования полной системы P450 ВМЗ заключался в анализе поверхностей домена FAD (PDB ID – 4DQK) и комплекса из двух других доменов: гем-содержащего монооксигеназного и FMN-содержащего (PDB ID – 1BVY), а также в поиске возможных комплементарных фрагментов. Из литературных данных известно о предположительном взаимном расположении исследуемых субъединиц [3], поэтому нет необ-

ходимости проведения полномасштабного белок-белкового докинга и сканирования всего пространства взаимных ориентаций двух белковых структур.

В программе Discovery Studio Visualizer 2019 макромолекулы ориентировались относительно друг друга согласно известной последовательности [3, 10, 11] таким образом, чтобы активные центры FAD- и FMN-содержащих доменов находились на расстоянии 7 Å, а петля из аминокислотных остатков 729–743 располагалась в пространстве между гем-содержащим и FMN-содержащим доменами (рис. 2, А). Недостающие аминокислотные остатки, соединяющие домены, были достроены вручную, исходя из данных об аминокислотной последовательности. В полученной промежуточной структуре из активного центра монооксигеназного домена временно вырезали гем (в связи со сложностью описания силовыми полями иона Fe(III)), а затем добавляли протоны. Наличие или отсутствие протона на имидазольном кольце остатка гистидина выбирали на основе визуального анализа локального окружения его боковой цепи. Для первичной релаксации пространственной конфигурации достроенных аминокислотных остатков проводили оптимизацию геометрических параметров в программном пакете NAMD 2.12 [12], при этом известные из данных рентгеноструктурного анализа фрагменты белка фиксировались.

С помощью модуля psfgen программы VMD [13] конструировали единую структуру P450 ВМЗ. Затем проводили сольватацию системы в прямоугольный параллелепипед из молекул воды так, чтобы расстояние от белка до границы ячейки составляло не менее 12 Å. При оптимизации геометрических параметров белковых макромолекул использовали силовые поля CHARMM36 [14], CGenFF (для кофакторов) [15] и TIP3P (для воды) [16]. Далее в течение 1 нс проводили релаксацию сольватирующих водных оболочек методом молекулярной динамики с использованием программы NAMD 2.12. Расчеты проводили в каноническом ансамбле NPT с шагом интегрирования 1 фс и  $T = 300$  К, при этом вся белковая система и кофакторы были заморожены. В полученной структуре обрезали сольватную оболочку на расстоянии от белка не менее, чем 4 Å, а вырезанный ранее Fe-протопорфирин IX с Fe(III) возвращался в ВМЗ. Исходная и финальная структуры представлены на рис. 2.

В работе проанализированы межсубъединичные контакты в полученной нами структуре. На рис. 3 показана полученная полноатомная



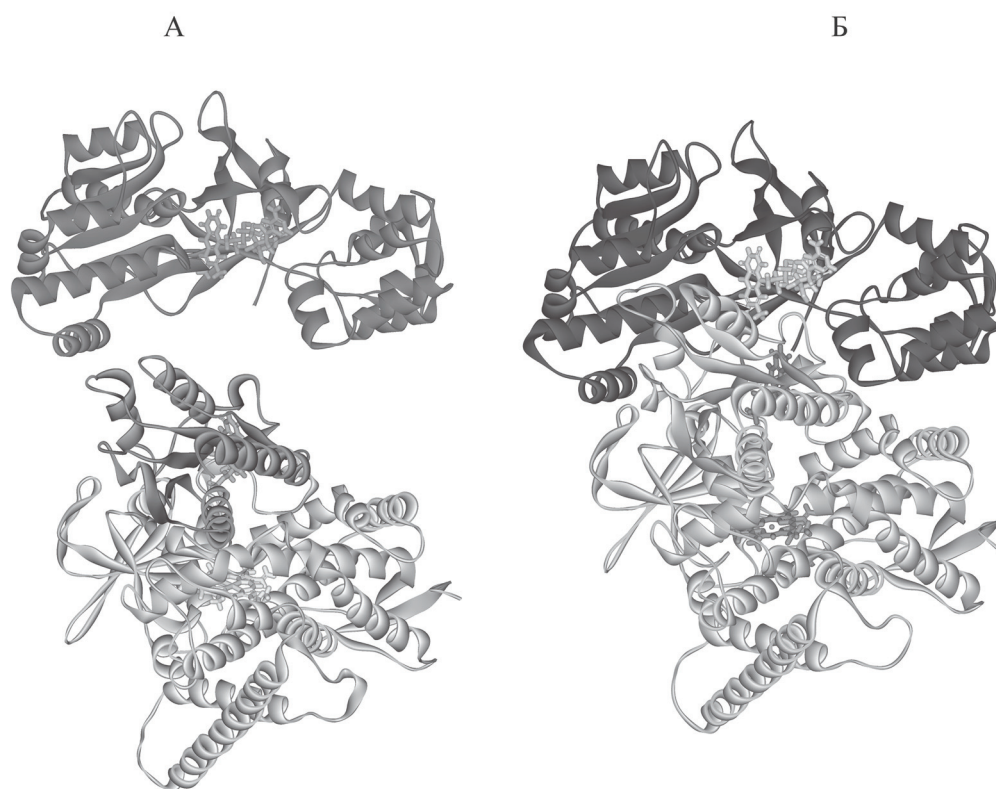


Рис. 2. А – отдельные исходные кристаллические структуры FAD-содержащего домена (PDB ID : 4DQK) и комплекса из двух других доменов – гем-содержащего монооксигеназного и FMN-содержащего (PDB ID: 1BVY); Б – полученная полноатомная модельная структура цитохрома P450 BM3

структура цитохрома P450 BM3 в ракурсе, удобном для визуального анализа таких контактов. Из этого рисунка хорошо видно, что межсубъединичный контакт между FAD- и FMN-содержащими доменами имеет гораздо большую площадь по сравнению с таковой для межсубъединичного контакта между FMN-содержащим и монооксигеназным доменами. В исходной структуре комплекса FMN-содержащего и монооксигеназного доменов PDB 1BVY, использованной для получения модели полноразмерного цитохрома P450 BM3, имеются две водородные связи между остатками Arg498 – Asn101 и Asn573 – Ser383 и три гидрофобных контакта между остатками Arg498 – Pro105, Met505 – Pro244 и Met505 – Lys241. В полноатомной модельной структуре к вышеупомянутым пяти контактам добавляются еще четыре водородные связи между остатками Asn489 – Gln387, Glu494 – His100, Glu610 – Tyr305, Asp499 – Gln110 и один гидрофобный контакт Arg498 – Leu104 (всего пять). Таким образом, в полученной структуре по сравнению с исходной структурой PDB 1BVY число взаимодействий в межсубъединичном контакте между

FMN-содержащим и монооксигеназным доменами возрастает в два раза – с пяти до десяти. Однако, как видно из рис. 3, в модельной структуре полноразмерного цитохрома P450 BM3 площадь межсубъединичного контакта между FAD- и FMN-содержащими доменами намного больше. Анализ структуры в области контакта между доменами FMN и FAD свидетельствует о том, что в этой области имеются десять водородных связей между следующими остатками: Asp608 – Arg676, Glu615 – Gln788, Asp607 – Arg762, Asp607 – Thr761, Arg600 – Lys791, Lys572 – Leu795, Ala575 – Arg798, Asp542 – Arg1030, His539 – Gly1003, Lys580 – Ser1004 и три гидрофобных контакта (Tyr578 – Leu795, Lys572 – Pro759, Lys580 – Ala1048). Таким образом, число контактов в области межсубъединичного взаимодействия между FAD- и FMN-содержащими доменами (13 контактов) ненамного превышает общее число контактов между субъединицами доменов FMN и BM3 (10 контактов), однако прочность взаимодействия между субъединицами в первом случае намного выше, поскольку 10 из 13 контактов обеспечены водородными

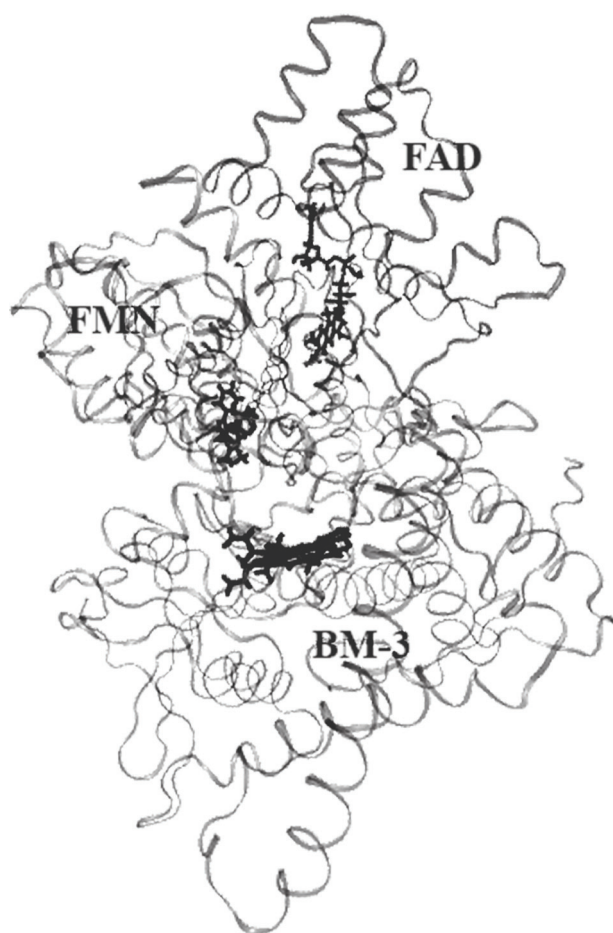


Рис. 3. Визуализация полученной полноатомной модельной структуры цитохрома P450 BM3 для оценки межсубъединичных контактов

связями, а во втором случае из 10 контактов такие взаимодействия имеют всего 6. Следует также отметить, что число взаимодействий в обоих межсубъединичных контактах в полноатомной модели цитохрома P450 BM3 находится на гра-

ни возможности образования олигомера. Например, в гомодимере оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis* число водородных связей между субъединицами составляет 12 [17, 18]. Димерная структура этого фермента сохраняется при комнатной температуре, однако увеличение температуры до 40 °C и выше приводит к диссоциации на мономеры с их последующей инактивацией [19]. Вероятно, одна из причин неудачных экспериментов по получению кристаллов целого фермента заключается в невысоком числе взаимодействий в межмолекулярных контактах цитохрома P450 BM3.

### Выводы

В результате проведенных исследований впервые была получена полноатомная трехмерная модель цитохрома P450 BM3. Анализ этой структуры свидетельствует о высокой степени ее достоверности. Она может быть использована в экспериментах по изучению взаимосвязи между структурой и функцией данного фермента, а также для использования подхода рационального дизайна в целях получения мутантных ферментов с новыми и улучшенными свойствами. Полученная модель также может быть использована для построения и анализа более сложных структур, например гибридных белков на основе цитохрома P450 BM3 и второго фермента.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского научного фонда (проект № 18-74-00146) с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова [20]. Конфликта интересов нет.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Neeli R., Girvan H.M., Lawrence A., Warren M.J., Leys D., Scrutton N.S., Munro A.W. // FEBS Lett. 2005. Vol. 579. P. 5582.
2. Girvan H.M., Munro A.W. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2016. Vol. 31. P. 136.
3. Joyce M.G., Ekanem I.S., Roitel O., Dunford A.J., Neeli R., Girvan H.M., Baker G.J., Curtis R.A., Munro A.W. Leys D. // FEBS J. 2012. Vol. 279. P. 1694.
4. Sevrioukova I.F., Li H., Zhang H., Peterson J.A., Poulos T.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. P. 1863.
5. Bridges A., Gruenke L., Chang Y.T., Vakser I.A., Loew G., Waskell L. // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 17036.
6. Shimizu T., Tateishi T., H. M. Fujii-Kuriyama. // J. Biol. Chem. 1991. Vol. 266. P. 3372.
7. Stayton P. S., Sligar. S. G. // Biochemistry. 1991. Vol. 30. P. 7381.
8. Wada A., Waterman M.R. // J. Biol. Chem., 1992, Vol. 267. P. 22877.
9. Roccatano D. // J. Phys. Condens. Matter. 2015. Vol 27. P. 273102.
10. Guengerich F.P., Michael R. Waterman M.R., Egli M. // Trends Pharmacol. Sci. 2016. Vol. 37. P. 625.
11. Ludwig M.L., Pattridge K.A., Metzger A.L., Dixon M.M., Eren M., Feng Y., Swenson R.P. // Biochemistry. 1997. Vol. 36. P. 1259
12. Nelson M.T., Humphrey W.F. Gursoy A., Dalke A., Kalé L.V., Skeel R.D., Schulten K. // Int. J. Supercomp. Appl. High Perform. Comp. 1996. Vol. 10. P. 251. 1996.
13. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // J. Mol. Graph. Model. 1996. Vol. 14. P. 33
14. Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S., Karplus M. // J. Comput. Chem. 1983. Vol. 4 (2). P. 187
15. MacKerell Jr. A.D., Bashford D., Bellott M., Dun-

- brack Jr. R.L., Evanseck J.D., Field M.J., Fischer S., Gao J., Guo H., Ha S., Joseph-McCarthy D., Kuchnir L., Kuczera K., Lau F.T.K., Mattos C., Michnick S., Ngo T., Nguyen D.T., Prodhom B., Reiher W.E., Roux B., Schlenkerich M., Smith J.C., Stote R., Straub J., Watanabe M., Wiórkiewicz-Kuczera J., Yin D., Karplus M. // *J. Phys. Chem.* 1998. Vol. 102. P. 3586.
16. Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C. // *J. Comput. Chem.* 2010. Vol. 31. P. 671.
17. Tishkov, V.I., Khoronenkova, S.V. // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. Vol. 70. N 1. P. 40. DOI: 10.1007/s10541-005-0050-2
18. Tishkov V.I., Khoronenkova S.V., Cherskova N.V., Savin S.S., Uporov I.V. // *Moscow Univ. Chem. Bull.*, 2010. Vol. 65. N 3. P. 121. DOI: 10.3103/S0027131410030028
19. Cherskova, N.V., Khoronenkova, S.V., Tishkov, V.I. // *Rus. Chem. Bull.* 2010. Vol. 59. N 1. P. 269 (DOI: 10.1007/s11172-010-0072-9).
20. Voevodin V.I., Antonov A., Nikitenko D., Shvets P., Sobolev S., Sidorov I., Stefanov K., Voevodin V.I., Zhumatiy S. // *Supercomput. Front. Innov.* 2019. Vol. 6. P. 4.

Поступила в редакцию 10.01.2020

Получена после доработки 12.01.2020

Принята к публикации 20.01.2020

## FULL STRUCTURE MODELING OF THREE-DOMAINS MONOOXYGENASE CYP102A1 BM3 FROM *BACILLUS MEGATERIUM*

A.V. Krivitskaya<sup>1,3</sup>, A.A. Pometun<sup>2,3,4\*</sup>, P.D. Parshin<sup>2,4</sup>, M.G. Khrenova<sup>2,3</sup>, V.B. Urlacher<sup>5</sup>, V.I. Tishkov<sup>2,3,4\*</sup>

(<sup>1</sup> Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology; <sup>2</sup> M.V. Lomonosov Moscow State University; <sup>3</sup> A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences; <sup>4</sup> Innovations and High Technologies MSU Ltd; <sup>5</sup> Institute of Biochemistry, Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; e-mail: aapometun@gmail.com, vitishkov@gmail.com)

The 3D full-atom model of the whole-size CYP102A1 from *Bacillus megaterium* (cytochrome P450 BM3) has been constructed using molecular modeling methods. The structure model was constructed using crystal structures of the separate FAD-binding domain (PDB ID: 4DQK) and the complex of FMN-binding and monooxygenase domains (PDB ID: 1BVY). Modeling procedure included analysis of the domains' surfaces to find the orientation with maximum inter-subunit contacts. The overall configuration of the obtained complex was optimized using molecular dynamics. The final full-atom structure model shows rather tight interactions between FAD- and FMN-binding domains due to 10 inter-domain hydrogen bonds and hydrophobic interactions between three pairs of amino acid residues. This 3D model can be used for structure-function studies and rational design of the enzyme as well as for construction of hybrid supramolecular structures of biocatalysts with cytochrome P450 BM3.

**Key words:** cytochrome P450 BM3, molecular modeling, 3D structure.

**Сведения об авторах:** Кривицкая Александра Вячеславовна – магистрант кафедры квантовой химии Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева (al\_krivickaya@mail.ru); Пометун Анастасия Александровна – науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ст. науч. сотр. ООО «Иновации и высокие технологии МГУ, науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (aapometun@gmail.com); Паршин Павел Дмитриевич – мл. науч. сотр. ООО «Иновации и высокие технологии МГУ», аспирант химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (parshin.p04@gmail.com); Хренова Мария Григорьевна – вед. науч. сотр. лаборатории химической кибернетики кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, руководитель группы молекулярного моделирования, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, доктор физ.-матем. наук (wasabiko@lcc.chem.msu.ru); Урлахер Влада Бениаминовна – профессор Института биохимии Дюссельдорфского университета им. Генриха Гейне, Ph.D. (Vlada.Urlacher@uni-duesseldorf.de); Тишков Владимир Иванович – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ООО «Иновации и высокие технологии МГУ», профессор, докт. хим. наук (vitishkov@gmail.com).