

P19-2009-29

Х. Т. Холмуродов\*, Н. А. Колтовая

МД-МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНАЗЫ CDK2-ЦИКЛИН А:  
ВЛИЯНИЕ ЗАМЕНЫ АМИНОКИСЛОТ Gly16 → Ser16  
И Arg274 → Gln274 НА КОНФОРМАЦИЮ  
КИНАЗНОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ

Направлено в журнал «Биофизика»

---

\*mirzo@jinr.ru

Холмуродов Х. Т., Колтовая Н. А.

P19-2009-29

МД-моделирование киназы CDK2-циклин А: влияние замены аминокислот Gly16 → Ser16 и Arg274 → Gln274 на конформацию киназной субъединицы

Проведен анализ наносекундной МД (молекулярной динамики) движения комплекса активной киназы CDK2/АТР. МД-моделирование мутантных структур киназы с заменами аминокислот CDK2-G16S в G-богатой петле малого кулачка и CDK2-R274Q в большом кулаке показало важность этих аминокислот и их влияние на конформацию киназы CDK2, проявляющуюся в возрастании расстояния между G- и T-петлями у соответствующих мутантных форм. Полученные результаты показывают, что мутации дестабилизируют локальную структуру в области T-петли. Мутация Arg274 → Gln274 в удаленной C-концевой области имеет более выраженный эффект и приводит к разрыхлению структуры киназы и увеличению расстояния между G- и T-петлями.

Работа выполнена в Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2009

Kholmurodov Kh. T., Koltovaya N. A.

P19-2009-29

MD Simulation of Kinase CDK2-Cyclin A: the Effect of Gly16 → Ser16 and Arg274 → Gln274 Substitutions on the Conformational Structure of Kinase Subunit

Nanoseconds long MD (molecular dynamics) trajectories of the active protein kinase CDK2/ATP complex were analyzed. The MD simulations of corresponding substitutions CDK2-G16S in conserved G-loop of a small lobe and CDK2-R274Q of a large lobe showed the importance of these amino acid residues in the structural conformation. The essential conformational changes of the CDK2 structure, particularly the increase of distance between the G- and T-loops, are observed. The obtained results indicate that the inducing of both Gly16 → Ser16 and Arg274 → Gln274 mutations destabilize locally the kinase structure around the T-loop area. The mutation Arg274 → Gln274 has a more pronounced effect considering the details of the G- and T-loop regions.

The investigation has been performed at the Laboratory of Radiation Biology, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2009

## ВВЕДЕНИЕ

Прохождение эукариотической клетки через основные стадии клеточного цикла опосредуется последовательной сборкой и активацией циклинзависимых киназ (CDK), относящихся к семейству серин-треониновых киназ. Время активации киназы определяется их посттранскрипционной модификацией (фосфорилирование/дефосфорилирование) и ассоциацией с белками, названными циклинами и являющимися регуляторными субъединицами киназных комплексов. Известно восемь киназ (CDK1-CDK8) и пять циклинов. Данная работа посвящена изучению киназы CDK2.

Сама по себе киназа CDK2 не активна. Для активации киназы необходимо связывание с регуляторной субъединицей циклином. Киназа CDK2 образует комплексы с циклинами A и E и необходима для прохождения G1/S. На рис. 1 приведена структура киназы в комплексе с циклином A. Связывание киназы с циклином изменяет конформацию киназной щели, определяющей ориентацию молекулы АТФ и субстрата. G- и T- петли киназы являются существенными элементами интерфейса щели. Они расположены по разные стороны от молекулы АТФ. Посттранскрипционное фосфорилирование Thr160 в T-петле и остатков Thr14 и Tyr15 в G-петле обеспечивает полную активацию киназы. На базе кристаллической решетки киназы CDK2 (Jeffrey et al., 1995) проводят МД-моделирование структуры киназных комплексов (Bartova et al., 2004; Кретов и др., 2007; Холмуродов и др., 2006). В данной работе с помощью компьютерного моделирования изучали влияние на структуру киназы двух мутационных замен аминокислотных остатков: локализованной в G-петле мутации Gly16Ser и локализованной далеко от активационного центра мутации Arg274Gln.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для МД-моделирования использовали модуль SANDER программного пакета AMBER (Case et al., 2003) для специализированного компьютера MDGRAPE-2 (Narumi et al., 1999; Okimoto et al., 2003). Начальная геометрия комплекса задана согласно кристаллической решетке, полученной с помо-

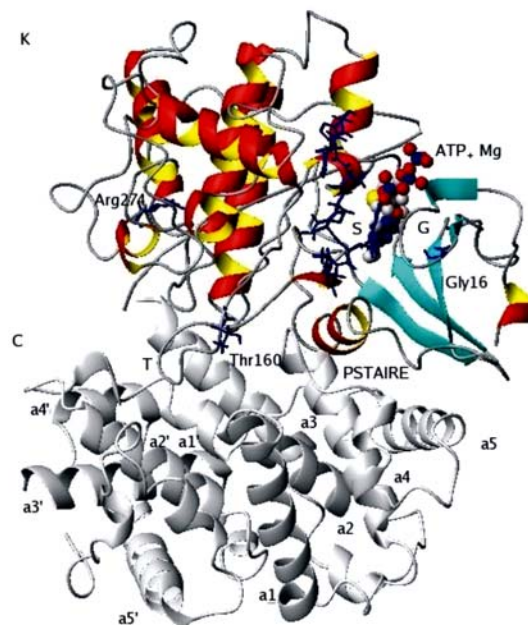


Рис. 1. Кристаллическая структура киназы человека CDK2 (файл 1QMZ из базы данных PDB). Белковый комплекс состоит из киназы (К) и циклина А (С). Используются следующие обозначения: N — N-кулак (ост. 1-85), С — С-кулак (ост. 86-298), G — G-петля (ост. 11-18), Т — Т-петля (ост. 147-167), PSTAIRE (ост. 45-51), S — субстрат (HNASPRK), ATP+Mg — комплекс АТФ с ионом магния. Также отрезками прямой изображены атомы аминокислотных остатков Thr160 (сайт фосфорилирования в Т-петле), Gly16 (сайт мутационного замещения глицина на серин в G-петле), Arg274 (сайт мутационного замещения аргинина на глутамин) и субстрат. Серым цветом представлена структура циклина, симметрично-зеркальные спирали циклина обозначены  $\alpha 1-\alpha 5$  (ост. 208-303) и  $\alpha 1'-\alpha 5'$  (ост. 309-399)

щью рентгеноструктурного анализа (файл 1QMZ; Brookhaven Protein Data Bank <http://www.pdb.org>).

Компьютерное МД-моделирование включало в себя три последующих этапа (Kholmurodov, 2005). На первом этапе осуществляли молекулярно-механическое (ММ) вычисление минимума энергии кристаллического состояния белка с окружающим водным раствором. Сольватацию системы проводили при помощи процедуры сольватации моделью TIP3P воды в заданном сферическом объеме (Jorgensen et al., 1983). Для расчета длин связей, включающих только атомы водорода, использовали стандартный метод SHAKE (Ryckaert et al., 1977). Второй этап моделирования — нагревание

системы с минимальным значением энергии от кристаллического состояния при  $T = 0$  К до физиологических температур  $T = 300$  К. При этом поиск структуры комплекса, которая отвечала бы минимуму энергии при  $T = 300$  К, производился при очень медленном увеличении температуры с шагом около 25 К. Третий этап — непосредственно сам процесс МД-вычисления: после доведения системы до энергетически минимизированных состояний при  $T = 300$  К ( $t = 0$ ) температура системы поддерживалась постоянной (300 К) в течение двух миллионов шагов с помощью алгоритма Берендсена со временем релаксации термостата 0,2 пс (Berendsen et al., 1984).

Шаг интегрирования ньютоновских уравнений движения равен 1 фс, а общее время моделирования составило 2000 пс. Были вычислены все атомно-молекулярные взаимодействия, траектории всех атомов и найдена структура всего белкового комплекса. При моделировании CDK2 применили метод атомно-силового поля Корнелла (Cornell et al., 1995). Энергетическое состояние системы или общий потенциал взаимодействия, соответствовало равновесному положению системы, в котором силы притяжения уравновешивались силами отталкивания (Kholmurodov, 2005). Учитывались различные типы взаимодействий, стабилизирующих структуру белка:

$U(r) = \sum K_r(r-r_{eq})^2$  — потенциал внутримолекулярных (валентных) связей;  
 $+\sum K_\theta(\theta-\theta_{eq})^2$  — потенциал угловых связей (вращений);  
 $+\sum K_\phi/2(1 + \cos[n\phi-\gamma])$  — потенциал дигедральных (торсионных) вращений;  
 $+\sum [A_{ij}/r_{ij}^{12} - B_{ij}/r_{ij}^6]$  — потенциал невалентных (вандерваальсовых) взаимодействий;  
 $+\sum q_i q_j / \epsilon r_{ij}$  — электростатический потенциал.

Результаты моделирования и трехмерные изображения белкового комплекса CDK2 анализировали с помощью программных пакетов RasMol (Sayle, Milner-White, 1995) и MOLMOL (Koradi et al., 1996).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа активной формы киназы CDK2/циклин А и двух мутантных форм CDK2-G16S и CDK2-R274Q с помощью компьютерного моделирования приведены на рис. 2. На рисунке показаны значения среднеквадратичных отклонений смещения атомов (RMSD) различных частей белкового комплекса киназы CDK2. Равновесные положения атомов для каждого из трех комплексов рассчитаны с шагом 1 фс на протяжении 2 нс. За это время комплексы достигли равновесного состояния. Равновесная структура мутантных комплексов CDK2-Ser16 и CDK2-Gln274 практически не отличается от начальной. Однако первая мутация изменяет структуру киназы (рис. 2, а) и ци-

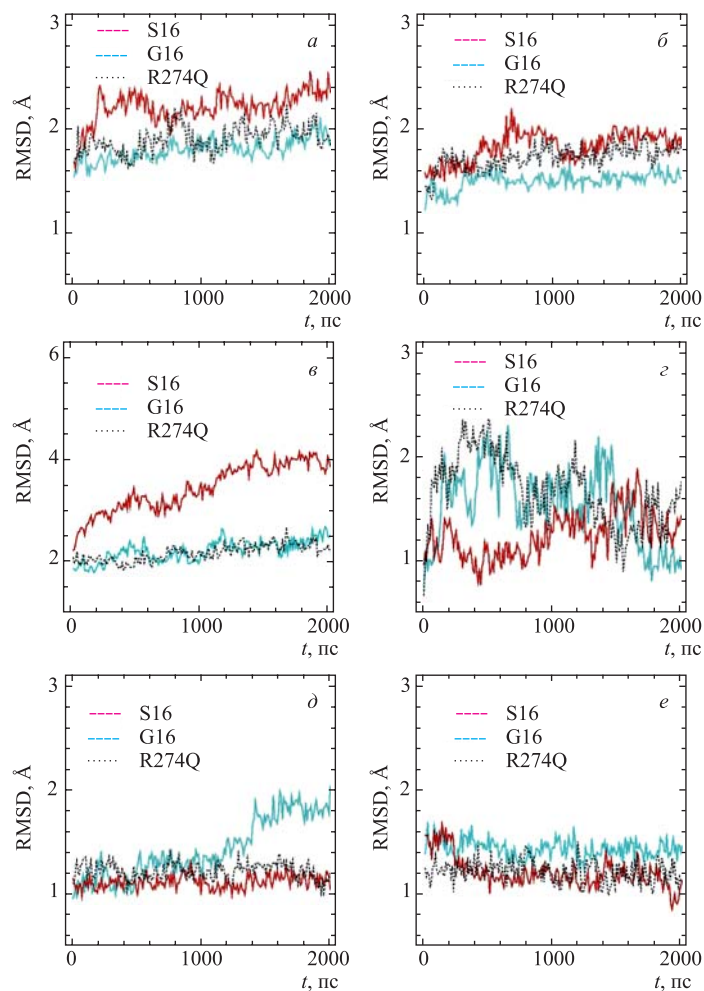


Рис. 2. Значения среднеквадратичных отклонений смещений атомов (RMSD) различных частей белкового комплекса активной формы киназы CDK2: *a* — киназа (ост. 1-296); *б* — циклин (ост. 297-554); *в* — суммарно киназа и циклин; *г* — субстрат (ост. 557-563); *д* — Т-петля (ост. 147-167) и *е* — G-петля (ост. 11-18). Светлые кривые — для нативной структуры Gly16/Arg274 (модели *a*), темные — для мутантной структуры Ser16/Arg274 (модели II) и точечные кривые — для мутантной структуры Gly16/Gln274 (модели III)

клина (рис. 2, *б*), более сильные изменения наблюдаются для киназа+циклин (рис. 2, *в*). Вторая мутация не влияет в той же степени, что и первая мутация,

на структуру киназы (рис. 2, *a*) и киназа+циклин (рис. 2, *б*), однако сильно изменяет структуру циклина (рис. 2, *в*). Если рассмотреть отдельные элементы киназы, то обе мутации сохраняют структуру Т-петли, в то время как у немутантного штамма она изменяется (рис. 2, *д*). G-петля изменяется меньше и практически совпадает для всех трех форм (рис. 2, *е*).

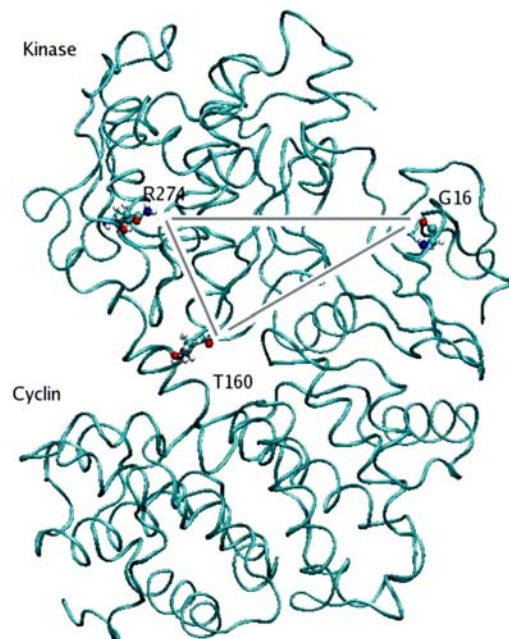


Рис. 3. «Характеристический треугольник», образованный тремя аминокислотными остатками киназы: Gly16 в G-петле, Arg274 в С-конце и Thr160 в Т-петле

Для характеристики изменений конформации киназы использовали три аминокислотных остатка киназы, локализованных в N-концевой G-петле малого кулачка (Gly16), в центральном участке киназы в Т-петле (Thr160) и в С-концевом участке большого кулачка (Arg274) (рис. 3). Изменения расстояний между реперными аминокислотными остатками для трех форм киназы CDK2 приведены на рис. 4, *a*: model I соответствует форме киназы дикого типа Gly16 Arg274, model II соответствует мутантной форме киназы Ser16 Arg274 и model III — мутантной форме Gly16 Gln274. На рисунке также приводится положение спирали  $\alpha 1$  малого кулачка киназы, в которой локализована консервативная последовательность PSTAIRE, ответственная за связывание с циклинами.

На нижних диаграммах (рис. 4, *б*) представлены результаты динамических изменений относительного положения реперных аминокислот. Оценивали

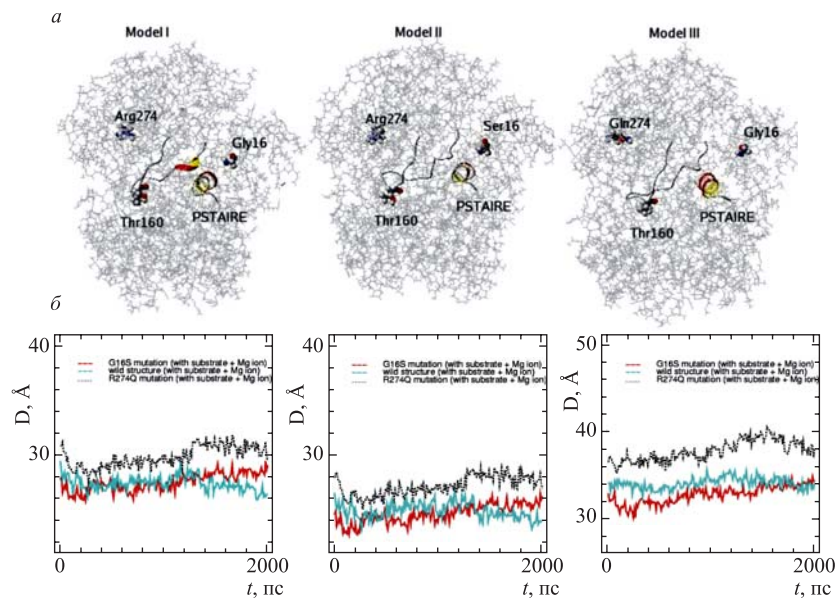


Рис. 4. Локализация (а) и диаграммы расстояний (б) для реперных аминокислотных остатков Gly16, Arg274 и Thr160

расстояния между атомами кислорода карбоксильных групп аминокислотных остатков (Gly/Ser)16 — Thr160, Thr160 — (Arg/Gln)274 и (Gly/Ser)16 — (Arg/Gln)274. Видно, что для второй мутантной формы (model III) наблюдаются большие смещения, чем для первой мутантной формы (model II). Для CDK2-Gln274 все три анализируемые расстояния увеличились на 4 Å по сравнению с CDK2-Arg274, в то время как для CDK2-Ser16 остаток Thr160 сместился на 2 Å относительно остальных остатков, причем расстояние между Arg274 и Ser16 осталось таким же, как и в немутантной форме CDK2-Gly16. Таким образом, мутация Arg274 → Gln274 приводит к формированию более рыхлой структуры киназы по сравнению с мутацией Gly16 → Ser16.

Представляет интерес сопоставление данных компьютерного моделирования с генетическими и биохимическими данными. Известно, что у почкующихся дрожжей соответствующие мутации вызывают нарушение функционирования киназы, проявляющееся в повышении радиочувствительности, нарушении чекпойнт-контроля и снижении генетической стабильности у мутантов *cdc28-srm*-[Gly20Ser] (Devin et al., 1990; Koltovaya et al., 1998; Холмуродов и др., 2006; Колтовая, 2009; Кадышевская, Колтовая, 2009) и в термочувствительности мутанта *cdc28-13*-[Arg283Gln] (Lurincz and Reed, 1986). Глицины в положении 11, 13 и 16 (у дрожжей 15, 17 и 20) консервативны для всех



известных киназ. Прямых биохимических данных по мутации Gly16 нет. Однако для киназы человека показано, что замены на аланин аминокислотных остатков, локализованных ближе к N-концу, в положении 8, 9 и 12 вызывают снижение связывания с циклинами, а в положении 20, 22, 23 и 24 — снижение киназной активности в пять раз (Marcote et al., 1993). Мутация Arg274Ala не влияет на связывание с циклином, но снижает связывание с регуляторным белком Suc1 (Marcote et al., 1993). Полученные результаты не дают завершенной картины. Требуются дальнейшие исследования структурных изменений мутантных форм киназы и выявление корреляций между конформационными и функциональными изменениями киназы.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность директору Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ профессору Е. А. Красавину за постоянный интерес и поддержку в работе. Настоящая работа была выполнена при поддержке компьютерных технических средств Лаборатории вычислительной астрофизики Института физических и химических исследований (РИКЕН), Япония (Computational Astrophysics Laboratory (CAL) of the Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Japan). Авторы выражают глубокую признательность лаборатории за предоставленное компьютерное время для работы на суперкомпьютере и компьютере специального назначения MDGRAPE-2 при проведении расчетов молекулярной динамики белковых молекул и директору лаборатории профессору Toshikazu Ebisuzaki за поддержку программных лицензионных продуктов и эксплуатации компьютеров MDGRAPE-2 с общей производительностью 25 терафлопс.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Jeffrey P. D., Russo A. A., Polyak K., Gibbs E., Hurwitz J., Massague J., Pavletich N. P. Mechanism of CDK Activation Revealed by the Structure of a Cyclin A-CDK2 Complex // *Nature*. 1995. V. 373. P. 313–320.
2. Bártoová I., Otyepla M., Kříž Z., Koča J. Activation and Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase-2 by Phosphorylation; a Molecular Dynamics Study Reveals the Functional Importance of the Glycine-Rich Loop // *Protein Science*. 2006. V. 13. P. 1449–1457.
3. Кретов Д.А., Холмуродов Х.Т., Колтовая Н.А. Анализ связей между АТФ и каталитической субъединицей киназы (нативной и мутантной) с помощью МД-моделирования кристаллической решетки активной киназы CDK2 // *Журн. физ. хим.* 2007. Т. 81, № 10. С. 1891–1896.

4. Холмуродов Х. Т., Кретов Д. А., Герасимова А. С., Колтовая Н. А. Молекулярно-динамическое моделирование замены консервативного глицина на серин в G-петле у мутанта *cdc28-srm* дрожжей с использованием кристаллической решетки киназы CDK2 человека // Биофизика. 2006. Т. 51, вып. 4. С. 679–691.
5. Case D. A., Pearlman D. A., Caldwell J. W., Cheatham III T. E., Ross W. S., Simmerling C. L., Darden T. A., Merz K. M., Stanton R. V., Cheng A. L., Vincent J. J., Crowley M., Ferguson D. M., Radmer R. J., Seibel G. L., Singh U. C., Weiner P. K., Kollman P. A. AMBER 8.0. University of California, 2003.
6. Narumi T., Susukita R., Ebisuzaki T., McNiven G., Elmergreen B. // Mol. Simul. 1999. V. 21. P. 401–415; Narumi T., Susukita R., Furusawa H., Yasuoka K., Kawai A., Koishi T., Ebisuzaki T. MDM version of AMBER. 2000.
7. Okimoto N., Yamanaka K., Suenaga A., Hirano Y., Futatsugi N., Narumi T., Yasuoka K., Susukita R., Koishi T., Furusawa H., Kawai A., Hata M., Hoshino T., Ebisuzaki T. Molecular Dynamics Simulations of Prion Proteins — Effect of Ala117  $\Rightarrow$  val // Mutation. Chem-Bio Informatics J. 2003. V. 3, № 1. P. 1–11.
8. Cornell W. D., Cieplak P., Bayly C. I., Gould I. R., Merz Jr. K. M., Ferguson D. M., Spellmeyer D. C., Fox T., Caldwell J. W., Kollman P. A. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids and Organic Molecules // J. Am. Chem. Soc. 1995. V. 117. P. 5179–5197.
9. Jorgensen W. L., Chandrasekhar J., Madura J. D. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water // J. Chem. Phys. 1983. V. 79. P. 926–935.
10. Berendsen H. J. C., Postma J. P. M., van Gunsteren W. F., DiNola A., Haak J. R. Molecular Dynamics with Coupling to an External bath // J. Chem. Phys. 1984. V. 81. P. 3684–3690.
11. Ryckaert J. P., Ciccotti G., Berendsen H. J. C. Numerical-Integration of Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints — Molecular-Dynamics of N-Alkanes // J. Comput. Phys. 1997. V. 23. P. 327–341.
12. Kholmurodov Kh. Molecular-Dynamics Simulations of Rhodopsin and Prion Proteins: The Effect of Disease-Related Amino Acid Mutations on Their Structural Conformations // PEPAN Physics of Particles and Nuclei. 2005. V. 36, № 2. P. 1–16.
13. Sayle R. A., Milner-White E. J. RasMol: Biomolecular Graphics for All // Trends in Biochem. Sci. 1995. V. 20. P. 374–376.
14. Koradi R., Billeter M., Wuthrich K. MOLMOL: a Program for Display and Analysis of Macromolecular Structure // J. Mol. Graphics. 1996. V. 4. P. 51–55.
15. Devin A. B., Prosvirova T., Peshekhonov V. T., Chepurная O. V., Smirnova M. E., Koltovaya N. A. et al. The Start Gene *CDC28* and Genetic Stability of Yeast // Yeast. 1990. V. 6. P. 231–243.

16. *Koltovaya N. A., Arman I. P., Devin A. B.* Mutations of the *CDC28* Gene and the Radiation Sensitivity of *Saccharomyces Cerevisiae* // *Yeast*. 1998. V. 14. P. 133–146.
17. *Кадышевская Е. Ю., Колтовая Н. А.* Участие генов *SRM5/CDC28*, *SRM8/NET1*, *SRM12/HF11* в чекпойнт-контроле у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. // *Генетика*. 2009. Т. 45, № 4.
18. *Колтовая Н. А.* Активация репарации и чекпойнт-контроля двуниевыми разрывами ДНК. Каскад активационного фосфорилирования белков // *Генетика*. 2009. Т. 45, № 1. С. 5–21.
19. *Lörincz A. T., Reed S. I.* // *Mol. Cell. Biol.* 1986. V. 6, № 11. P. 4099–4103.
20. *Marcote M. J., Knighton D. R., Basi G., Sowadski J. M., Brambilla P., Draetta G, Taylor S. S.* A Three-Dimensional Model of the Cdc2 Protein Kinase: Localization of Cyclin- and Suc1-Binding Regions and Phosphorylation Sites // *Mol. Cell. Biol.* 1993. V. 8. P. 5122–5131.

Получено 19 февраля 2009 г.

Редактор *М. И. Зарубина*

Подписано в печать 22.04.2009.

Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 0,75. Уч.-изд. л. 0,89. Тираж 220 экз. Заказ № 56577.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований  
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.

E-mail: [publish@jinr.ru](mailto:publish@jinr.ru)

[www.jinr.ru/publish/](http://www.jinr.ru/publish/)