

КОМПЬЮТЕРНАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ГИПОТЕЗ ИНАКТИВИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ЗАМЕНЫ PRO32 НА THR32 ИНОЗИН ТРИФОСФАТ ПИРОФОСФАТАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Душанов Э.Б., Алтайский М.В.¹, Колтовая Н.А.

Объединенный институт ядерных исследований, Лаборатория радиационной биологии,
Россия, 141980, Московская область, г. Дубна, ул. Жолио-Кюри 6, Тел.: (8-49621) 6 34 32,
факс: (8-49621) 6 59 48, E-mail: koltovaya@jinr.ru

¹Институт космических исследований, Россия, 117997, Москва, ул. Профсоюзная 84/32

Ферменты нуклеозидтрифосфат пиррофосфогидролазы гидролизуют неканонические нуклеозидтрифосфаты до нуклеозидмонофосфатов и пиррофосфата, и таким образом выводят их из метаболических процессов. У человека известен полиморфизм гена, кодирующего инозинтрифосфат пиррофосфатазу (ИТРА). У человека достаточно широко распространена мутация R32T-hИТРА, наличие которой может влиять на чувствительность пациентов к лекарственным препаратам. Замена Pro32Thr вызывает полную инактивацию димерного фермента ИТРА у гомозиготного мутанта и снижение активности до 25 % у гетерозигот. Анализ кристаллической структуры ИТРА дикого и мутантного типов выявил сильные изменения положения петли, в которой локализована замена. Было выдвинуто два предположения: а) замена влияет на взаимодействие между двумя субъединицами, и б) в мутантной петле гидрофобный остаток Phe31 выступает из гидрофобного кармана в водную среду и служит сигналом для протеасомной деградации белка.

В данной работе мы осуществили восстановление аминокислот, отсутствующих в исходной для моделирования структуре димера дикого типа PDB:2J4E, и исследовали структуру фермента с помощью полноатомной молекулярной динамики в поле GAFF в период времени 20 нс. Рассмотрели все возможные варианты димера. Субстрат инозинтрифосфат (ИТР) стабилизировался спустя примерно 3 нс от начала моделирования для всех субъединиц. Время релаксации субъединиц составило около 4 нс, но если рассматривать димер в целом, то стабилизировался только димер дикого типа. Анализ водородных связей между кулачками субъединиц димера показал, что существуют устойчивые водородные связи между нижними и верхними кулачками. Однако у мутанта снижено количество устойчивых водородных связей, причем, у гомодимеров в большей степени, чем у гетеродимерных мутантов. Поскольку замена Pro32Thr вызывает ослабление водородных связей у мутантных белков, то моделирование подтвердило правомочность первой гипотезы. Анализ торсионных углов фрагмента Lys30-Phe31-Pro32 показывает, что фенольная группа аминокислотного остатка Phe31 менее стабильна во всех мутантных моделях. В кристаллической мутантной структуре PDB:4F95 этот угол составлял $+76,8^\circ$, т.е. развернулся на 180° . По данным наших расчетов его значение варьировало около -80° , и, следовательно, вторая гипотеза не подтвердилась. Исследования методом молекулярной динамики дополняют теоретические исследования методами вычислительной квантовой химии процесса нуклеофильной реакции и ферментативной активности разных форм фосфатазы.