

## В ПОИСКАХ ИДЕАЛЬНОГО АНТИОКСИДАНТА: МОДЕЛИРОВАНИЕ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ В ПЕРОКСИРЕДОКСИНЕ 6 ЧЕЛОВЕКА

Е. В. Захарова<sup>1,2</sup>, М. С. Кондратьев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Институт Биофизики Клетки

Поступила в редакцию 10.09.2018 г.

**Аннотация.** На базе современных методов компьютерной химии нами выполнен анализ структуры и взаимодействий в комплексах известного антиоксидантного белка пероксиредоксина 6 человека с лигандами тиоловой природы (низкомолекулярные тиоловые соединения: сукцимер, каптоприл, цистамин, унитиол; короткие цистеинсодержащие пептиды: КСКСК, ЕСЕСЕ и ССССС). Данный белок находит все более разнообразное применение в качестве антиоксиданта. Механизм действия пероксиредоксина был изучен ранее, но эффективный восстановитель до сих пор не известен. Поиск и понимание характера взаимодействий данного белка с перспективными восстановителями остаётся актуальной задачей, решение которой позволит успешно применять фермент в медицинской практике и пролонгировать терапевтический эффект. В работе представлен *in silico* анализ возможностей для проведения *in vitro* точечного мутагенеза пероксиредоксина 6. При помощи методов гибкого молекулярного докинга было показано, что остатки Arg41, Lys125 и Glu121 оказывают наибольшее влияние во взаимодействии тиоловых восстановителей с поверхностью Prx6, а множественные замены в периферическом слое глобулы не только негативно влияют на связывание лигандов, но и вносят доказанный дестабилизирующий эффект на структуру белка. Было обнаружено, что цистамин и полицистеиновый пептид (ССССС) мало чувствительны ко взаимодействиям с аланиновыми мутантами пероксиредоксина 6 (полученным в результате аланинового скрининга). Такая малая чувствительность лигандов, которые являются тиолами и должны проявлять нуклеофильные свойства, потребовала детального изучения в квантово-химическом приближении. Было предположено, что она может объясняться полученными для них низкими значениями разницы между энергиями вакантных и заполненных молекулярных орбиталей (НОМО/LUMO), а следовательно – высокой реакционной способностью указанных двух лигандов. Предлагаемые нами мутации в структуре пероксиредоксина 6 человека были апробированы *in silico* – при помощи метода молекулярной динамики, и рекомендованы к экспериментальной проверке.

**Ключевые слова:** пероксиредоксин, молекулярный докинг, тиоловые соединения, восстановитель, молекулярное моделирование, точечный мутагенез

Антиоксиданты представляют собой вещества, которые находясь в концентрациях меньших, чем окисляемый субстрат, замедляют или вовсе препятствуют его окислению. По своему происхождению антиоксиданты могут быть различной природы, как эндогенные, так и экзогенные, они могут представлять собой соединения различных классов – белки, фенолы, короткие олигопептиды, нуклеозиды и даже наночастицы [1,2]. Все эти молекулы необходимы для защиты от оксидативных стрессов и в целом для существования и роста организмов в кислородсодержащем окружении, а

работая вместе они формируют антиоксидантную систему организма (АОС).

Но что же является источником оксидативных стрессов? Реактивные метаболиты (в т.ч. активные формы кислорода – АФК), несмотря на то, что постоянно образуются в ходе нормального метаболизма клетки, могут приводить к патологическим состояниям. Из-за их неконтролируемой избыточной продукции АФК в результате, например, воздействия ионизирующего излучения, возникают патологические состояния, приводящие не только к локальным повреждениям в клетке, но и к тяжёлым нейродегенеративным заболеваниям, атеросклерозу, психическим расстройствам [3,4].

Именно для предотвращения развития такого сценария необходима активность АОС.

Для работы был выбран белок пероксиредоксин 6 (Prx6) человека, который является пероксидазой и относится к молодому семейству тиолспецифических антиоксидантных белков. Представители семейства Prx характеризуются высокой консервативностью аминокислотной последовательности и структуры пероксидазного центра. Однако, помимо наличия у всех пероксиредоксинов пероксидазного остатка цистеина (Cr), некоторые имеют и второй – восстанавливающий цистеин (Cr). Такое различие в структуре активного центра ведёт к различию каталитического цикла у пероксиредоксинов, что служит основой для разделения этого обширного семейства белков на три группы – типичные 2-Cys (Prx1-4), атипичные 2-Cys (Prx5) и 1-Cys (Prx6)[5] (Табл. 1). Каталитический цикл всех представителей Prx включает 3 основных этапа: перекисное окисление, формирование дисульфидной связи и высвобождение пероксидазного остатка цистеина, т.е. рециркуляция фермента и его возврат в нативное состояние. Белки, относящиеся к типичным (представителям группы) 2-Cys (Prx1-4) и атипичным 2-Cys (Prx5) пероксиредоксинам осуществляют второй этап за счёт формирования либо внутримолекулярной дисульфидной связи внутри одной субъединицы, либо межмолекулярной между двумя субъединицами белка.

Исследуемый нами Prx6 (Рис. 1) относится к группе 1-Cys пероксиредоксинов и, следовательно, не имеет в своей структуре Cr и в связи с этим подвержен переходу в переокисленное неактивное состояние. Для решения проблемы быстрой потери активности предлагается поиск тиоловых восстановителей,

которые и смогут быть донорами –SH группы для пероксиредоксина и поддерживать его активное рабочее состояние. Её предполагаемыми донорами могут быть глутатион [8] или иные тиолсодержащие соединения. По аналогии с каталитическим циклом 2-Cys пероксиредоксинов, тиол образует смешанную дисульфидную связь (Cr-S-S-R) с ферментом с последующим ее восстановлением вторым донорным тиолом и, таким образом, фермент рециркулирует. Однако из-за отсутствия восстанавливающего остатка цистеина окисленная на первом этапе до сульфеновой кислоты (Cr-SOH) тиогруппа цистеина может окисляться и дальше до переокисленных состояний – сульфиновой (Cr-SO<sub>2</sub>H) и сульфоновой (Cr-SO<sub>3</sub>H) кислот [9]. Выход из переокисления и регенерация белка возможна только в случае Cr-SO<sub>2</sub>H с затратой АТФ и привлечением белков-партнёров [10], а Cr-SO<sub>3</sub>H является необратимо окисленной формой, приводящей к потере пероксидазной активности.

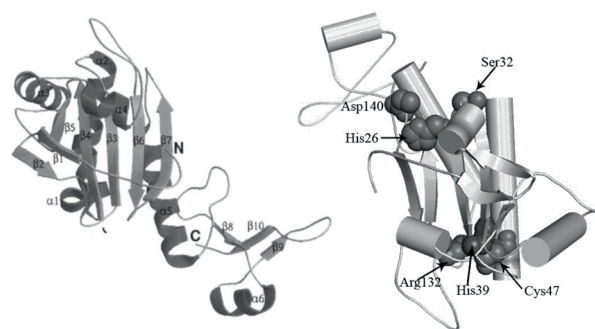


Рис. 1. Структура Prx6 человека по Choi et al. [7] (слева отмечены основные структурные элементы, справа – а.к. остатки пероксидазного (His39, Cys47, Arg132) и фосфолипидного (His26, Ser32, Asp140) центров).

Таблица 1.

Сравнение групп пероксиредоксинов по данным работ [6,7].

Группа	Типичные 2-Cys				Атипичные 2-Cys	1-Cys
	Prx1	Prx2	Prx3	Prx4	Prx5	Prx6
Субстраты	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , органические гидроперекиси					-/- гидроперекиси фосфолипидов
Донор электронов	Тиоредоксин, глутатион	Тиоредоксин		Тиоредоксин, глутатион	Тиоредоксин	?
Локализация в клетке	Цитозоль		МТХ	ПМ	МТХ, пероксисомы, цитозоль	Плазма
Строение	Димер	Димер, декамер	Димер		Мономер	
Длина белка (АК)	199	198	256	271	214	224
Cr	+	+	+	+	+	+
Cr	+	+	+	+	+	-
Активность PLA <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	+

В наибольшей степени пероксиредоксин 6 представлен в эпителиальных тканях, где он играет важную роль в их антиоксидантной защите [11,12]. Защитная функция Prx6 проявляется и при различных патологиях лёгких, глаз, кожи и нервной системы [13–15]. Наиболее перспективным является использование пероксиредоксина в терапии заболеваний, патологические процессы которых связаны с оксидативным стрессом. Терапевтическое применение для лечения ран и химических ожогов дыхательных путей было показано на примере крыс В.И. Новосёловым [12,16]. В настоящее время рассматривается перспектива применения пероксиредоксина в качестве радиопротектора [17,18].

В данной работе целью было более подробное изучение взаимодействия Prx6 с лигандами-восстановителями, определение аминокислотных остатков, вносящих наибольший вклад в это взаимодействие и анализ влияния аминокислотных замен на стабильность белка.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

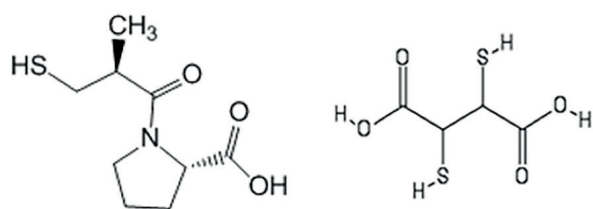
### Исследуемые молекулы

Показано, что наиболее активными восстановителями для данного белка могут являться тиоловые соединения: капторил и короткий цистеин-содержащий пептид ECECE. Для них выявлены два сайта связывания – типичный, образованный АК остатками Arg41, Ile73, Asp74, Ser75, Arg106, Asn107, Arg108, Lys122, Asp123, Glu124, Lys125, и атипичный, расположенный ближе к N-концевому участку молекулы и образованный Ala16, Asn17, Arg22, Asp104, Asp105, Arg106, Asn107. Данное разделение сайтов было основано на частоте связывания лигандов в каждом из них – типичный выступал наиболее вероятным сайтом связывания для большинства лигандов, а для молекулы сукцимера наибольшее сродство было показано к новому атипичному сайту [19].

Для гибкого молекулярного докинга использовались 7 молекул: 4 тиоловых соединения – цистамин, каптоприл, сукцимер, унитиол (рис. 2) и 3 цистеин-содержащих пептида – ECECE, KCKCK и CCCCC. Выбор таких лигандов обусловлен тем, что тиоловые соединения активно применяются в медицине – в качестве антиоксидантов (в том числе в спортивной медицине). Выбранные молекулы входят в регистр лекарственных средств России (<https://www.rlsnet.ru/>) и применяются как антитоды при отравлениях тяжёлыми металлами, ртутью, мышьяком, в качестве радиопротекторов,

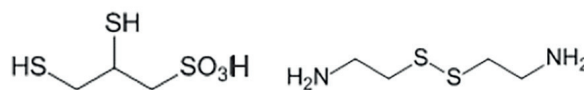
для коррекции артериального давления и кардиопротективного действия.

Пептиды с цистеином были выбраны как потенциальные биогенные доноры протонов – для проверки гипотезы о том, как влияют АК остатки цистеина эндогенного происхождения на связывание с исследуемым белком, а также влияние микроокружения на это связывание – положительно заряженных АК остатков (KCKCK), отрицательно (ECECE) и полностью нейтральной молекулы (CCCCC).



Каптоприл

Сукцимер



Унитиол

Цистамин

Рис. 2. Структурные формулы тиоловых лигандов.

Рецептор – белок пероксиредоксин 6 человека и его мутантные формы (7 мутантов полного сайта связывания и 18 мутантов с точечными заменами). Мутанты полного сайта связывания были получены путём замены всех аминокислотных остатков, участвующих в связывании того или иного лиганда на аланин с целью подтвердить гипотезу о том, что при «выключении» сайта связывания соответствующий ему лиганд перестанет связываться в этом месте.

1. Мутант для сайта связывания унитиола (Arg41, Ile73, Asp74, Arg106, Arg108, Glu124, Lys125);
2. Цистамина (Ile73, Asp74, Arg106, Asn107, Arg108, Glu121, Asp123, Gly124, Lys125);
3. Каптоприла (Arg41, Ile73, Asp74, Arg106, Asn107, Arg108, Glu121, Glu124, Lys125);
4. Сукцимера в атипичном сайте (Ala16, Asn17, Arg22, Asp104, Asp105, Arg106, Asn107);
5. Сукцимера в типичном сайте (Arg41, Ile73, Asp74, Arg108, Asp123, Glu124, Lys125);
6. Пептида ECECE (Arg41, Ile73, Asp74, Ser75, Arg106, Asn107, Arg108, Glu121, Lys122, Asp123, Glu124, Lys125);

7. Пептида KCKCK (Arg41, Asp42, Phe43, Ile73, Asp74, Asp78, Arg106, Asn107, Arg108, Glu121, Lys122, Glu124, Lys125).

Для аланинового скрининга, т.е. последовательной замены каждого из 18 аминокислотных остатков, участвующих в связывании лигандов, на аланин нами были созданы мутанты по следующим остаткам – Arg22, Arg41, Arg106, Arg108, Asn17, Asn107, Asp42, Asp74, Asp105, Asp123, Glu121, Glu124, Ile73, Lys122, Lys125, Phe43 и Ser75.

Для дополнительной оценки влияния мутаций на расчётную стабильность белка нами был воспроизведён ещё один, наиболее термостабильный, мутант (V10E+N107D+I165D+D183K) созданный в нашей лаборатории на основе крысиного Prx6. Фермент из организма крысы *Rattus rattus* является самым термостабильным из известных пероксиредоксинов и отличается высокой степенью гомологии с человеческим белком – в них отличаются только 19 остатков из 204. Анализ пространственной локализации этих остатков, отличающих два белка, выявил всего четыре остатка, замена которых удовлетворяет критериям концепции альтернативного водородного связывания. Согласно этой концепции при увеличении количества водородных связей на поверхности глобулы повышается её жёсткость и, следовательно, термостабильность [20].

## ПРОГРАММНЫЕ ПАКЕТЫ

Модели тиоловых лигандов были построены в молекулярном конструкторе HyperChem 8.0.10 (<http://www.hyper.com/>), затем их геометрия была оптимизирована с помощью MM+ и для уточнения структуры и расстановки зарядов – с помощью PM3.

Пространственная структура Prx6 была взята нами из RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). Точечные мутации в модель исследуемый белок мы вносили с помощью программного пакета SwissPDB (<https://spdbv.vital-it.ch/>). Таким образом, был получен набор структур, каждая из которых была рассмотрена нами как мишень для молекулярного докинга.

Для задания углов свободного торсионного вращения лигандов нами был использован пакет Autodock tools (<http://autodock.scripps.edu/resources/adt>), в котором также была определена «коробка докинга» для белка. Докинг осуществлялся в Autodock Vina (<http://vina.scripps.edu>) в пяти повторностях – с целью повышения точно-

сти и воспроизводимости результатов (для снижения влияния фактора “random seed” – случайного выбора программой первого положения лиганда на рецепторе и конформации самого лиганда).

Анализ связывания лиганд-рецептор был произведён первично в Autodock tools (выявление сайта связывания на поверхности белка – типичный/атипичный/ошибочный), затем в пакете LigPlot+ с построением развёрток, наглядно демонстрирующих межмолекулярные взаимодействия (гидрофобные и путём образования водородных связей), а также длины образовавшихся водородных связей.

Расчёт динамического поведения проводили в распараллеленном на GPU пакете GROMACS «OpenMM Zephyr» (<https://simtk.org/projects/zephyr>), время симуляции составило 10000 пс (10 нс), шаг – 0.002 пс при температуре 300К с учётом растворителя в неявном виде (через диэлектрическую проницаемость), в силовом поле AMBER96. Анализ полученной траектории в формате GROMACS проводили с помощью VMD (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>). В рамках обработки полученных траекторий молекулярной динамики нами были построены графики изменения величины среднеквадратичного отклонения (RMSD) координат атомов белка от первоначальной структуры с течением времени, которые дают наглядное представление об изменении структуры белка во время молекулярной динамики нативной и мутантных форм изучаемого белка – пероксиредосина 6 человека.

Для более полного изучения свойств электронной структуры лигандов мы провели квантово-химические расчёты с использованием параметризации PM7, реализованной в пакете MORAC2016 (Molecular Orbital PACkage) (<http://openmopac.net/>) для определения локализации и энергий НОМО/ЛУМО (высшая занятая молекулярная орбиталь, низшая свободная молекулярная орбиталь), также величины GAP – «щели» между НОМО и ЛУМО. Значение (величина) GAP предположительно влияет на способность лигандов верно узнавать типичный/атипичный сайт и связываться с ними. Стоит отметить, что расчёт в MORAC2016 проводился с использованием ключей, которые запрещали использование молекулярно-механических приближений в расчете, устанавливали градиент сходимости в 0,01 ккал/моль/ангстрем, а значение критерия ССП заменяли на  $1 \cdot 10^{-12}$ . Визуализация полученных результатов была выполнена в HyperChem 8.0.10.



## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

После проведения докинга с мутантами для всех сайтов связывания выдвинутая нами гипотеза о том, что при «выключении» сайта связывания для каждого лиганда он перестанет там связываться, в целом подтвердилась – большинство мутантов перестали связывать свои лиганды в прежних сайтах связывания, характерных для нативного белка. Мутанты для каптоприла и унитиола полностью перестали связывать свои лиганды, а аффинность по сравнению с нативным белком также упала с -5.56 до -4.56 ккал/моль для каптоприла и с -3.12 до -2.9 для унитиола. Созданные нами мутанты для сукцимера также подтвердили гипотезу – мутант с заменой всех аминокислотных остатков (АО) типичного сайта связывал сукцимер только в атипичном с энергией -4.42 ккал/моль, а с заменой всех АО атипичного сайта – только в типичном с энергией -4.40. Полученные значения аффинности для этих мутантов не так значительно отличаются от нативного белка (-4.48), что также подтверждает выдвинутое предположение.

Мутант для цистамина не перестал связывать свой лиганд в типичном сайте и в непосредственной его близости, однако энергия этого связывания уменьшилась с -3.12 до -2.9 ккал/моль. Для пептидов мы наблюдали сходную ситуацию. ЕСЕСЕ продолжал связываться в типичном сайте, но реже. Лизин-цистеиновый пептид КСКК не только продолжил связываться в том же сайте, но и частота такого связывания увеличилась, а энергия почти не изменилась (-5.42 ккал/моль).

Для анализа результатов аланинового скрининга 18 мутантов были разделены на 4 группы по природе боковой группы аминокислот, по которым были произведены мутации – замены неполярных (F3A, I73A), полярных (N17A, N107A, S75A), отрицательно (D42A, D74A, D104A, D105A, D123A, E121A, E124A) и положительно (K122A, K125A, R22A, R41A, R106A, R108A) заряженных остатков (см. Табл. 2).

При внесении мутаций не было отмечено резкой смены сайта связывания лигандов, однако, мутации, затрагивающие полярные остатки, позитивно влияя на связывание, тем не менее оказывали доказанное дестабилизирующее влияние на трёхмерную укладку и термостабильность белка [21]. Замены неполярных АО не привели к изменению сайтов связывания и аффинности для всех лигандов. При замене полярных незаряженных АО были отмечены незначительные изменения в энергиях связывания.

Из всего набора лигандов для цистамина не были отмечены какие-либо изменения в связывании с белком. Сукцимер продемонстрировал нечувствительность к аланиновому скринингу – молекула лиганда все также связывалась в двух сайтах (типичном и атипичном), предпочтительнее был атипичный. С мутантом R22A сукцимер резко потерял сродство к атипичному сайту, предположительно, именно этот остаток отвечает за связывание сукцимера с атипичным сайтом.

Каптоприл менее активно связывали мутанты K125A и R41A. Для этих же мутантов было отмечено и снижение по модулю энергии связывания с каптоприлом: -5 и -4.9 ккал/моль по сравнению с -5.56 ккал/моль для нативного белка. Было выдвинуто предположение, что эти остатки и вносят наибольший вклад в лиганд-белковое взаимодействие, для его доказательства был проведен расчёт докинга для двойного мутанта. Полученные результаты подтвердили гипотезу: аффинность понизилась до -4.8 ккал/моль.

Подобная картина наблюдалась и для унитиола: данный лиганд слабее связывался с мутантами R41A и E121A. Пептиды, помимо изменений в предпочтительных местах связывания, демонстрировали весьма сильное взаимодействие с мутантами D104A и R106A (аффинность для этих мутантов не значительно отличалась от нативного белка, а в некоторых случаях даже была выше, см. Табл. 2). Эти модифицированные формы пероксиредоксина связывали тиоловые соединения в виде «перекидывания» их молекулярного остова через обе бороздки связывания (типичный и атипичный сайты). На рис. 3 приведён пример такого «необычного» связывания (мутант R106A, лиганд – ЕСЕСЕ). Полицистеиновый пептид в расчётах показал более эффективное связывание с мутантами, чем с нативным белком.

Таким образом, можно отметить, что наибольшее влияние на связывание лиганда с белком оказывают замены заряженных АО (аргинина, лизина, аспартата и глутамата). Модифицированные таким образом мишени для докинга демонстрируют как понижение, так и повышение сродства лигандов к белку.

Поскольку вносимые мутации расположены в периферическом слое глобулы, с высокой вероятностью они окажут влияние на динамическое поведение макромолекулы. Кроме того, данные мутации затрагивают заряженные аминокислотные остатки, что влияет на картину водородного связывания на поверхности глобулы, определяющего

термостабильность белка [20,22]. В работе было рассчитано динамическое поведение для мутантов всех участков связывания (где все АО, участвующие во взаимодействии с лигандами были заменены на аланин) и нескольких (R106A, R108A, R106A+R108A, V10E+N107D+I165D+D183K) мутантов с точечными заменами.

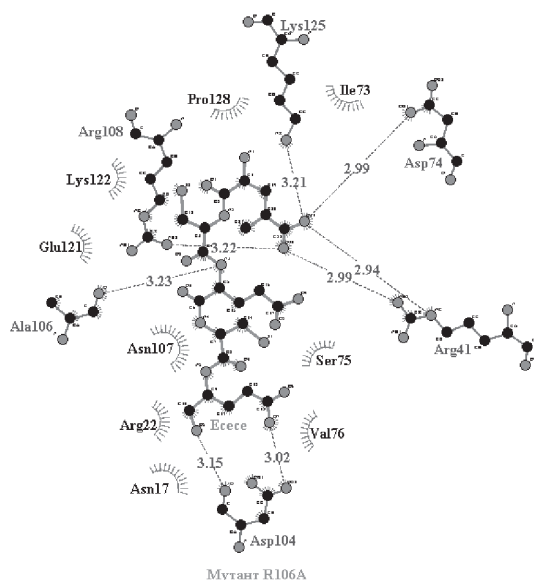


Рис. 3. Пример «необычного» связывания пептидов, мутант R106A, лиганд ЕСЕСЕ – связывание лиганда путём «перекидывания» их молекулярного остова через обе бороздки связывания.

В первом случае было отмечено как существенное, так и малое влияние замен на динамическое поведение структуры белка по причине разного набора остатков, по которым пероксиредоксин связывается с каждым из тиоловых и пептидных лигандов (Рис. 4). Мутанты сайта связывания унитиола и типичного сайта связывания сукцимера отличались лишь на один остаток – Arg106. Его сохранение привело к снижению общей подвижности молекулы (по RMSD), и в итоге расчётная ожидаемая термостабильность белка не отличалась от нативного пероксиредоксина. Остальные мутации значительно усиливали подвижность структуры.

Влияние аргинина на динамическое поведение белка потребовало дополнительного изучения. Были проведены расчёты теоретической термостабильности для мутантов с заменами (Рис. 5) – R106A, R108A, R106A+R108A и V10E+N107D+I165D+D183K. Остаток Arg108 является первым в четвертой  $\alpha$ -спирали и важен для её формирования, что может значительно повлиять на макроструктуру белка, однако он находится рядом с Arg106 и также участвует в связывании ли-

гандов. Подобную замену было интересно внести с целью рассмотреть влияние близко расположенных остатков на стабильность глобулы. Четверной мутант, созданный на основе крысиного Prx6, был использован в расчётах для сравнительного анализа полученных данных по динамическому поведению молекул. Полученные результаты показали, что замена ARG106 делает молекулу стабильнее и почти выводит расчётную термостабильность на один уровень с мутантом V10E+N107D+I165D+D183K.

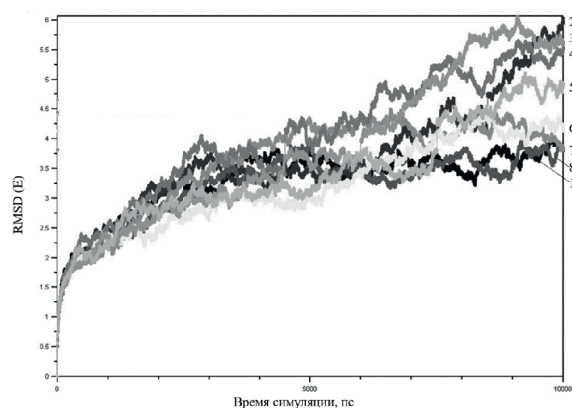


Рис. 4. Среднеквадратичное отклонение координат атомов белка от первоначальной структуры с течением времени для мутантов всех участков связывания. Расчёты проведены для температуре (300K). Траектория: 1 – нативного белка Prx6; 2 – 8 для мутантов полного сайта связывания для каждого лиганда: 2 – унитиола, 3 – цистамина, 4 – каптоприла, 5 – петида есесе, 6 – сукцимера в атипичном сайте, 7 – петида кксск и 8 – сукцимера в типичном сайте.

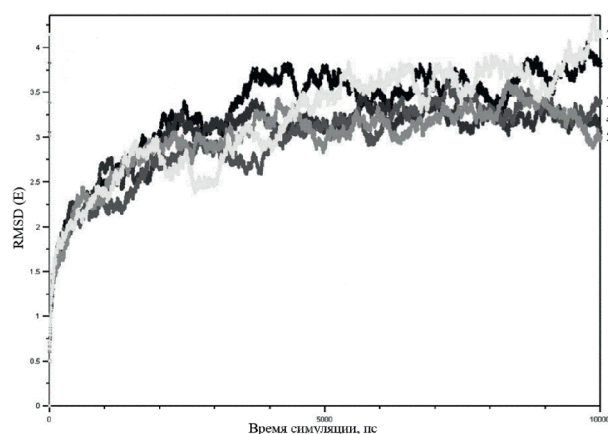


Рис. 5. Среднеквадратичное отклонение координат атомов белка от первоначальной структуры с течением времени для мутантов. Расчёты проведены для постоянной температуры (300K). Траектории: 1 – нативный Prx6; 2 – R106A; 3 – V10E+N107D+I165D+D183K; 4 – R108A; 5 – R106A+R108A.

Проводя сравнительный анализ результатов проведённых расчётов докинга, нами была отмечена как низкая чувствительность к вносимым заменам, так и её отсутствие для некоторых лигандов (например, для цистамина). Мы предположили, что между эффективностью связывания и разницей НОМО-LUMO возможна корреляция: чем меньше GAP, тем лучше (с большей энергией, в типичном/атипичном сайте) такой лиганд связывается на поверхности белка-мишени. Это основано на том, что при уменьшении GAP облегчается способность электронов с орбитали НОМО переходить на LUMO и образовывать межмолекулярные связи. Для всех лигандов и НОМО, и LUMO локализованы на атомах серы, что подтверждает их нуклеофильность. Однако, наименьшее значение GAP было показано для CCCCC и цистамина (-7.505 и -7.927), что по видимому объясняет их низкое связывание в типичном или атипичном сайтах, а также изменяет смысл предложенной нами корреляции – чем меньше GAP, тем с большей вероятностью такой лиганд будет связываться хаотично на поверхности белка-мишени.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы 18 аминокислотных остатков, участвующих в связывании лигандов, были точечно заменены на Ala, что продемонстрировало как существенную – в случае мутантов всех сайтов связывания, так и малую чувствительность (для

точечных мутантов) структуры белка к подобным мутациям.

По результатам аланинового скрининга наиболее вероятными аминокислотными остатками, влияющими на связывание с тиолами являются Arg41, Lys125 и Glu121. Тогда как остальные 17 точечных мутаций не затрагивают остатки, важные для правильного формирования третичной структуры белка, мутация по Arg108 может быть нежелательной, т.к. данный остаток является первым в спирали  $\alpha$ -4 и участвует в её стабилизации.

Расчёты динамического поведения мутантных форм Prx6 показали, что полная замена сайтов связывания с тиоловыми лигандами значительно дестабилизирует глобулу (аланин неполярная АК, и не образует водородных связей в тех местах, где они необходимы для стабилизации структуры белка).

Также были рассчитаны данные по локализации НОМО/LUMO и величине GAP для лигандов, которые показали, что предполагаемая корреляция между величиной GAP и эффективностью связывания имеет отличное значение от предположенного исходно (чем меньше GAP, тем эффективнее лиганд будет связываться в необходимом нам месте) – лиганды цистамин и CCCCC связываются с низкой частотой в интересующих нас сайтах именно из-за наименьшего значения GAP. Анализ распределения НОМО и LUMO подтвердил нуклеофильные свойства тиоловых соединений.

Полученные данные в будущем планируется проверить в ходе реального эксперимента.

Таблица 2.

Средние значения энергий связывания для мутантов аланинового скрининга.

Мутант	Средняя аффинность (по пяти раундам), ккал/моль						
	Сукцимер	Каптоприл	Цистамин	Унитиол	ЕСЕСЕ	ККККК	CCCCC
D42A	-4.43	-5.38	-3.18	-3.98	-5.25	-5.58	-4.28
D74A	-4.78	-5.40	-3.08	-3.75	-5.10	-5.73	-4.05
D104A	-4.38	-5.45	-3.18	-3.95	-5.18	-5.50	-4.20
D105A	-4.40	-5.45	-3.20	-3.88	-5.25	-5.63	-4.23
D123A	-4.38	-5.45	-3.13	-3.83	-4.83	-5.60	-4.13
E121A	-4.35	-5.45	-3.15	-4.00	-5.10	-5.55	-4.48
E124A	-4.30	-5.35	-3.73	-3.83	-5.38	-5.48	-4.53
F43A	-4.43	-5.45	-3.15	-3.85	-5.20	-5.50	-3.95
I73A	-4.30	-5.28	-3.18	-4.10	-5.40	-5.58	-4.40
K122A	-4.40	-5.40	-3.18	-3.90	-4.73	-5.60	-4.13
K125A	-4.50	-5.00	-3.03	-3.70	-5.10	-5.65	-4.60
N17A	-4.50	-5.40	-3.13	-3.85	-5.18	-5.63	-4.63
N107A	-4.40	-5.40	-3.08	-3.83	-5.13	-5.40	-4.15
R22A	-4.48	-5.40	-3.15	-3.85	-4.75	-5.38	-4.13
R41A	-4.33	-4.90	-3.15	-3.50	-4.63	-5.43	-4.53
R106A	-4.48	-5.63	-3.08	-3.80	-5.43	-5.45	-4.18
R108A	-4.50	-5.35	-3.38	-3.88	-5.05	-5.68	-4.43
S75A	-4.40	-5.40	-3.20	-3.80	-5.00	-5.85	-4.28
Нативный Prx6 [19]	-4.48	-5.56	-3.12	-3.78	-5.18	-5.64	-4.12

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гудков С.В., Брусков В.И., Куликов А.В., Шарапов М.Г., Куликов Д.А., Молочков А.В. // Альманах Клинической Медицины. 2014. № 31. С. 61–65, 65–69
2. Coyle J., Puttfarcken P. // Science. 1993. V. 262. P. 689–95.
3. Duracková Z. // Physiol Res. 2010. V. 59. P. 459–469.
4. Wood Z.A., Schröder E., Harris J.R., Poole L.B. // Trends Biochem. Sci. 2003. V. 28. P. 32–40.
5. O'Flaherty C. // Adv. Androl. 2014. P. 1–15.
6. Fujii J., Ikeda Y. // Redox Rep. 2002. V. 7. P. 123–130.
7. Choi H.J., Kang S.W., Yang C.H., Rhee S.G., Ryu S.E. // Nat. Struct. Biol. 1998. V. 5. I. 5. P. 400–406.
8. Manevich Y., Feinstein S.I., Fisher A.B. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2014. V. 101. P. 3780–3785.
9. Georgiou G., Masip L. // Science. 2003. V. 300. P. 592–594.
10. Benoît Biteau, Jean Labarre, Michel B. Toledano // Nature. 2003. V. 425. P. 980–984.
11. Новоселов В.И., Пешенко И.В., Новоселов С.В., Камзалов С.С., Быстрова М.Ф., Евдокимов В.А., Николаев Ю.В., Фесенко Е.Е. // Биофизика. 1999. Т. 44. С. 568–570.
12. Новоселов В.И., Барышникова Л.М., Янин В.А., Амелина С.Е., Фесенко Е.Е. // Доклады Академии Наук. 2003. С. 393
13. Manevich Y., Fisher A.B. // Free Radic. Biol. Med. 2005. V. 38. P. 1422–1432.
14. Kümin A., Huber C., Rüllicke T., Wolf E., Werner S. // Am. J. Pathol. 2006. V. 169. P. 1194–1205.
15. Kubo E., Fatma N., Akagi Y., Beier D.R., Singh S.P., Singh D.P. // Physiology. 2006. V. 6395. P. 842–855.
16. Новоселов В.И., Амелина С.Е., Кравченко И.Н., Новоселов С.В., Янин В.А., Садовников В.Б., Фесенко Е.Е. // Доклады Академии Наук. 2000. Т. 375. С. 831–833.
17. Sharapov M.G., Gudkov S. V., Gordeeva A.E., Karp O.E., Ivanov V.E., Shelkovskaya O. V., Bruskov V.I., Novoselov V.I., Fesenko E.E. // Dokl. Biochem. Biophys. 2016. V. 467. P. 110–112.
18. Sharapov M.G., Novoselov V.I., Fesenko E.E., Bruskov V.I., Gudkov S. V. // Free Radic. Res. 2017. V. 51. P. 148–166.
19. Кондратьев М.С., Захарова Е.В. // Биофизика. 2018. Т. 63 №. 5. С. 844–849.
20. Khechinashvili N.N., Fedorov M.V., Kabanov A.V., Monti S., Ghio C., Soda K. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2006. V. 24 P. 255–262.
21. Кондратьев М.С., Кабанов А.В., Комаров В.М., Хечинашвили Н.Н., Самченко А.А. // Биофизика. 2011. Т. 56. №. 5. С. 1045–1052.
22. Khechinashvili N.N., Kabanov A.V., Kondratyev M.S., Polozov R.V. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2014. V. 32. P. 1396–1405.

### ИБК РАН

\*Кондратьев М. С., к.ф.-м.н., заведующий Лабораторией структуры и динамики биомолекулярных систем.

E-mail: ma-ko@bk.ru

МГУ им. М.В.Ломоносова

Захарова Е. В. студентка

E-mail: zakharovaekaterina.97@yandex.ru

### ICB RAS

\*Kondratyev M. S., PhD. (physical and mathematical science), head of the Laboratory of structure and dynamics of biomolecular systems

E-mail: ma-ko@bk.ru

Lomonosov Moscow State University

Zakharova E. V., student

E-mail: zakharovaekaterina.97@yandex.ru

## SEARCHING FOR AN IDEAL ANTIOXIDANT: MODELING POINT MUTATIONS IN PEROXIREDOXIN 6

E. V. Zakharova<sup>1,2</sup>, M. S. Kondratyev<sup>2</sup>

1 – Lomonosov Moscow State University

2 – Institute of Cell Biophysics

**Abstract.** Based on modern methods of computer chemistry, we analyzed the structure and interactions in the complexes of the well-known antioxidant protein human peroxiredoxin 6 with ligands of a thiolic nature (low molecular weight thiol compounds: succimer, captopril, cystamine, unithiol; short cysteine-containing peptides: KCKCK, ECECE and CCCCC). This protein gets an ever-growing use as an antioxidant. The mechanism of activity of peroxiredoxin was studied previously, but an effective reducing agent is still



remains unknown. Search and understanding of the nature of the interactions of this protein with promising reducing agents remains an actual task, the solution of which will allow successfully applying the enzyme in medical practice and prolongate the therapeutic effect. This work presents an *in silico* analysis of the possibilities for carrying out *in vitro* point mutagenesis of peroxiredoxin 6. With help of flexible molecular docking methods, it was seen that Arg41, Lys125 and Glu121 have the greatest influence on the interaction of thiol reducing agents with the Prx6 surface. Multiple substitutions in the peripheral region of the globule can not only negatively affect the binding of ligands, but also bring a proved destabilizing effect on the structure of the protein. It was found that cystamine and polycysteine peptide (CCCCC) are not very sensitive to interactions with peroxiredoxin 6 alanine mutants (obtained from alanine screening). Such a low sensitivity of ligands, which are thiols and should exhibit nucleophilic properties, required a detailed study in a quantum-chemical approximation. It was suggested that this fact can be explained by the low values of the delta between the energies of the occupied and unoccupied molecular orbitals (HOMO/LUMO), and therefore the high reactivity of these two ligands. Our proposed mutations in the structure of human peroxiredoxin 6 were tested *in silico* - using the method of molecular dynamics, and recommended for experimental verification.

**Keywords:** peroxiredoxin, molecular docking, thiolic compounds, reducer, molecular modeling, point mutagenesis

## REFERENCES

1. Gudkov S.V., Bruskov V.I., Kulikov A.V., Bobylev A.G., Kulikov D.A., Molochkov A.V., Almanac of Clinical Medicine. 2014. No. 31. pp. 61-65, 65-69
2. Coyle J., Puttfarcken P., Science. 1993. Vol. 262. pp. 689-95.
3. Duracková Z., Physiol Res. 2010. Vol. 59. pp. 459-469.
4. Wood Z.A., Schröder E., Harris J.R., Poole L.B., Trends Biochem. Sci. 2003. Vol. 28. pp. 32-40.
5. O'Flaherty C., Adv. Androl. 2014. pp. 1-15.
6. Fujii J., Ikeda Y., Redox Rep. 2002. Vol. 7. pp. 123-130.
7. Choi H.J., Kang S.W., Yang C.H., Rhee S.G., Ryu S.E., Nat. Struct. Biol. 1998. Vol. 5. I. 5. pp. 400-406.
8. Manevich Y., Feinstein S.I., Fisher A.B., Proc. Natl. Acad. Sci. 2014. Vol. 101. pp. 3780-3785.
9. Georgiou G., Masip L., Science. 2003. Vol. 300. pp. 592-594.
10. Benoît Biteau, Jean Labarre, Michel B. Toledano, Nature. 2003. Vol. 425. pp. 980-984.
11. Novoselov V.I., Peshenko I.V., Novoselov S.V., Kamzalov S.S., Bystrova M.F., Evdokimov V.A., Nikolaev Ju.V., Fesenko E.E., Biophysics. 1999. Vol. 44. pp. 568-570.
12. Novoselov V.I., Baryshnikova L.M., Yanin V.A., Amelina S.E., Fesenko E.E., Dokl. Biochem. Biophys. 2003. Vol. 393
13. Manevich Y., Fisher A.B., Free Radic. Biol. Med. 2005. Vol. 38. pp. 1422-1432.
14. Kümin A., Huber C., Rüllicke T., Wolf E., Werner S., Am. J. Pathol. 2006. Vol. 169. pp. 1194-1205.
15. Kubo E., Fatma N., Akagi Y., Beier D.R., Singh S.P., Singh D.P., Physiology. 2006. Vol. 6395. pp. 842-855.
16. Novoselov V.I., Amelina S.E., Kravchenko I.N., Novoselov S.V., Yanin V.A., Sadovnikov V.B., Fesenko E.E., Dokl. Biochem. Biophys. 2000. Vol. 375. pp. 831-833.
17. Sharapov M.G., Gudkov S. V, Gordeeva A.E., Karp O.E., Ivanov V.E., Shelkovskaya O. V, Bruskov V.I., Novoselov V.I., Fesenko E.E., Dokl. Biochem. Biophys. 2016. Vol. 467. pp. 110-112.
18. Sharapov M.G., Novoselov V.I., Fesenko E.E., Bruskov V.I., Gudkov S. V., Free Radic. Res. 2017. Vol. 51. pp. 148-166.
19. Kondratyev M.S., Zakharova E.V., Biophysics. 2018. Vol. 63 I. 5. pp. 844-849.
20. Khechinashvili N.N., Fedorov M.V., Kabanov A.V., Monti S., Ghio C., Soda K., J. Biomol. Struct. Dyn. 2006. Vol. 24 pp. 255-262.
21. Kondratyev M.S., Kabanov A.V., Komarov V.M., Khechinashvili N.N., Samchenko A.A., Biophysics. 2011. Vol. 56. I. 5. pp. 1045-1052.
22. Khechinashvili N.N., Kabanov A.V., Kondratyev M.S., Polozov R.V., J. Biomol. Struct. Dyn. 2014. Vol. 32. pp. 1396-1405.