

## Плазмин - Project #455

### Гидролиз-активация плазмина

11.10.2021 17:28 - Alexander Zlobin

<b>Status:</b>	In Progress	<b>Start date:</b>	11.10.2021
<b>Priority:</b>	Normal	<b>Due date:</b>	28.02.2022
<b>Assignee:</b>	July Belyaeva	<b>% Done:</b>	0%
<b>Category:</b>			
<b>Target version:</b>			

#### Description

Часть отчетной кампании по Сириусу

Хотим пронаблюдать весь процесс между разрезанием активирующей петли и перестройкой сайта. Какие всплывают вопросы:

#### 1. Протонирования

Какое протонирование вероятнее всего в состоянии "только разрезалось"? Какое протонирование в состоянии плазмина? В соответствующих состояниях похожих ферментов (тромбин, трипсин)

1.1. Динамики Nneu-AspH и Nchg-Asp плазмина, сохранение геометрии кристалла

1.2. QM/MM metad на трансфер протона

#### 2. Процесс

Какие переменные нам дадут пронаблюдать процесс от А до Б? Знаем обе геометрии. 2D Q/Q? Или что-то поинтереснее?

#### History

#1 - 11.10.2021 18:05 - Alexander Zlobin

#### Задание на неделю 11-18

1.1. Посчитать в 3 повторностях динамики плазмина: Nneu-AspH и Nchg-Asp. CHARMM36m ибо в амбере нет нейтральных Н-концов.

#2 - 18.10.2021 13:49 - Alexander Zlobin

- Assignee changed from Alexander Zlobin to July Belyaeva

#3 - 18.10.2021 13:55 - Alexander Zlobin

Юля, как договаривались, передаю тебе этот тикет.

Папка, где я делал расчеты:

/home/domain/data/zlobin/2021/plasmin/plasmin-cut/charmm

Там есть папка wrong-sys, Это первыерезы, которые мне не понравились. Почему: вероятно из-за гистидинов 26 и 78 были структурные нарушения. Также у меня есть подозрения касательно глутамата 181, но поменьше.

В папке chg не внутри wrong-sys обновленная система. В ней в ходе релаксации нарушается строение триады - это к нашему разговору в телеграме, насколько вообще триады стабильны в отсутствие субстрата и т.п. Может быть это и фича, и байндинг-активатор нужен для дальнейшей стабилизации триады. Пока что стоит поделаться динамики этой системы подольше (скажем, 500 нс) и в повторностях, поначалу игнорируя эти неприятности с каталитическим серином. Сделать то же самое для системы псу.

Момент: я там делал замораживание триады в ходе релаксации, пожалуй стоит сделать ее заново без заморозки все же. Исходя из презумпции невиновности системы, пока что сосредоточиться на глобальных ивентах, которые могут быть следствием отсутствия

байндинг-активатора.

#### #4 - 28.10.2021 18:20 - July Belyaeva

Таблица со структурами плазмина/плазминогена, организм - *Homo sapiens*.

Не ставила ограничений по разрешению, оно указано в соответствующей колонке.

Ссылка: <https://docs.google.com/spreadsheets/d/14rD3HU-PN4gFy3fcam1stPUnRUdZUDGIOEq1S8AuYUg/edit?usp=sharing>

#### #5 - 28.10.2021 18:25 - Alexander Zlobin

- Status changed from New to In Progress

Дай, пожалуйста, право на редактирование

Думаю, еще стоит добавить инфу о том, кто из них мутант, кто нет

#### #6 - 12.11.2021 16:17 - July Belyaeva

##### Некоторые добавления по теории

1) Статья: [<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pro.2532>]

Рассматривается важность солевого мостика, формируемого между Ile16 и Asp194 (в случае плазмина на месте изолейцина - валин), для активации трипсина.

Авторы говорят следующее: в трипсиногене остаток Asp194 (в нотации химотрипсина) ориентирован в сторону от активационного кармана и взаимодействует с остатком His40 (в нотации химотрипсина). Активация трипсина может быть охарактеризована двумя ключевыми событиями: (i) вращением Asp194, его 'возвращением' в активационный карман (ii) вставкой N-концевого хвоста в карман связывания. С этими этапами связана перестройка активного сайта, и фермент активируется. Порядок этих двух шагов все еще обсуждается, хотя предполагалось, что внедрение N-хвоста происходит быстрее, чем разрыв взаимодействия Asp194-His40.

На Figure 2 приложенной статьи изображен предложенный авторами механизм активации трипсина, с примерами PDB-структур.

Авторы статьи делали моделирование MD для изучения процесса связывания N-конца с Asp194. В качестве стартовой, авторы использовали структуру трипсина 1984 года с разрешением 2.20 Å, кокристаллизованную с дипептидом Ile-Val (имитация NH<sub>3</sub><sup>+</sup> - хвоста).

После 400 нс MD-симуляции ничего примечательного не произошло. Тогда они начали делать aMD (accelerated MD). В этом случае им удалось наблюдать событие вставки NH<sub>3</sub><sup>+</sup> - конца, сопровождающееся вытеснением воды из активационного кармана и образованием солевого мостика Asp - Ile. Структура фермента, включая высококонсервативный сайт Ca<sup>2+</sup>, была стабильной во время моделирования. *Я не написала, что для старта использовалась и другая структура - 1TGS, в ней с аспаратом связывается остаток лизина.* Иллюстрация событий MD, aMD приведена на Figure 3 в статье.

Из интересного, что авторы говорят о результатах своих MD, aMD-симуляций с NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-концом и Lys:

*Солевой мостик Lys156 - Asp194 формировался и разрывался несколько раз, как в ходе классической, так и в ходе aMD-симуляции, давая возможность предполагать, что барьер, разделяющий эти две конфигурации (связанную и несвязанную) - невелик. Результаты показывают, что Lys156 не так стабильно держится в активационном кармане, как NH<sub>3</sub><sup>+</sup> - конец, ибо последний оставался в кармашке на протяжении всей MD и aMD-симуляции.*

Тут, конечно, может иметь место проблема стартового состояния, факт того, что NH<sub>3</sub><sup>+</sup> - конец имитировал дипептид.

Отмечу, что в некоторых статьях упоминается, что не для всех трипсиноподобных сериновых протеаз характерно взаимодействие Asp194 - His40 (<https://sci-hub.ru/10.1021/bi980951d>, <https://sci-hub.ru/10.1021/bi980951d>).

Для чего я упомянула эту статью? Из тех соображений, что:

а) можно будет отслеживать поведение гистидина в ходе динамики (того, что соответствует His40); авторы упоминали, что взаимодействие Asp194 - His40 не зависело от того, был ли гистидин заряжен (это не принимается на 100% как верная информация, прилагаю найденную информацию)

б) предполагаю, нужное состояние в активационном кармашке это Asp(-), Val(NH3+)

2) Статья: [[<https://www.nature.com/articles/s41598-017-03457-7>]]

Объект: uPA, принадлежит семейству трипсиноподобных сериновых протеаз.

PDB ID: 4DVA (1.94 Å)

В статье исследуется структура апо-формы сериновой протеазы uPA, разрешение достаточно хорошее. Можно использовать ее для сравнения с нашими результатами.

3) Статья: [[<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja021369m>]]

В статье рассматривается важность водородной связи (low-barrier hydrogen bond, LBHB), формируемой между His57 и Asp102, для увеличения скорости реакции ацилирования посредством стабилизации переходного состояния.

Опишем геометрические параметры предреакционного состояния, предложенные авторами статьи. Наличие следующих водородных связей:

NE His57 OG Ser195

ND His57 OD1 Asp102 2.723 Å

NH His57 OD2 Asp102.

В случае предреакционного комплекса (ES), две описанные выше водородные связи между гистидином и аспартатом сохранялись в течение практически всего времени симуляции. Двугранный угол  $\chi_2$  остатка His57 имел относительно постоянное значение - 90 +/- 10 градусов. Ротация имидазольного кольца гистидина ограничивалась упомянутыми выше водородными связями. **Водородная связь между гистидином и серином сохранялась в течение ~70% симуляционного времени.** Проверю, что происходит в нашем случае.

---

Прилагаю траекторию, укороченную, только белок: /home/domain/data/julybel/plasmin-2021/prep-Nch-Asp/fitted.xtc. Суммарно было 200 нс. На фрейме 2404 Asp103 отходит от своего 'триадного' положения, на 2406 образует солевой мостик с Lys102 (кратковременно). Позже посмотрю с водой и ионами, буду разбираться.

**#7 - 30.11.2021 12:29 - July Belyaeva**

- File prep.pse added

#### **Заметка для себя**

Трипсин в апо-форме: 5MNF

Разрешение: 0.99 Å (2018)

Переподготовлю систему, сделаю более долгую эквilibрацию, "пересажу" каталитические аспартат и гистидин

**#8 - 02.12.2021 17:59 - July Belyaeva**

#### **200-нс динамика (chg):**

/home/domain/data/julybel/plasmin-2021/prep-30-11-21/coo-nh3/fitted.xtc

/home/domain/data/julybel/plasmin-2021/prep-30-11-21/coo-nh3/prod.gro

#### **200-нс динамика (neu):**

/home/domain/data/julybel/plasmin-2021/prep-30-11-21/cooh-nh2-2/fitted.xtc

Результат: все умерли. Попробуем понять, почему.

Итак, **chg**. Имеем 2002 фрейма.

На 12 фрейме Asp103 отворачивается, на 28 - возвращается. На 48 фрейме аспартат снова отворачивается. На 451 фрейме HisD60 взаимодействует с Glu63 ("отгибается" вверх).

Stranger things: на 937 фрейме каталитический аспартат отвернут, каталитический гистидин связан водородной связью с Thr216 (уже долгое время по ходу траектории). На 938 фрейме Thr216 резко оказывается переориентированным (думаю, это следствие какого-то другого события), а Asp103 возвращается обратно, формирует водородные связи с каталитическим гистидином, и каталитическая триада выглядит практически хорошо. До 1029 триадные ребята как-то сосуществуют вместе. На 1030 фрейме Asp103 отворачивается от каталитических гистидина и серина, а Thr216 водородит HisD60.

*Проследим этот эффект*

**frame12** - Asp102 (отворачивается), **frame11** - Thr216 (--> His)  
**frame28** - Asp102 (возвращается), **frame27** - Thr216 (--> down)  
**frame48** - Asp102 (отворачивается), **frame48** - Thr216 (--> His)  
**frame351** - Thr216 (--> down), HO Asp102 все еще отвернут  
**frame378** - Thr216 (--> His), HO Asp102 все еще отвернут  
**frame529** - Asp102 (возвращается), **frame529** - Thr216 (--> down)  
**frame562** - Asp102 (отворачивается), **frame562** - Thr216 (--> His)  
**frame938** - Asp102 (возвращается), **frame938** - Thr216 (--> down)  
**frame1030** - Asp102 (отворачивается), **frame1030** - Thr216 (--> His)

*в целом, после этого адекватности не происходит*

**frame1032** - Thr216 (--> down), HO Asp102 все еще отвернут  
**frame1087** - Thr216 (--> His), HO Asp102 все еще отвернут  
**frame1152** - Thr216 (--> down), HO Asp102 все еще отвернут  
**frame1929** - Thr216 (--> His), HO Asp102 все еще отвернут  
**frame1935** - Thr216 (--> down), HO Asp102 все еще отвернут

*Дополнительные заметки*

**frame317** - спираль, на которой находится каталитический гистидин, будто бы кратковременно приподнимается. Похожее происходит на **frame341**.  
**frame392** - HisD60 меняет конформацию (загибается вверх)  
**frame465** - HisD60 (поворачивается обратно вниз)  
**frame1344** - HisD60 меняет конформацию (загибается вверх)  
**frame1423** - HisD60 (поворачивается обратно вниз)

*Полагаю, во время "аспартатных перестроек" происходят изменения геометрии остова на участке Gly219 - Gly214. Видела статью, которая говорила о важности глицинов в поддержании активной геометрии сериновых протеаз, но, к сожалению, потеряла.*

А теперь - **neu**. Имеем 2002 фрейма.

В данной системе мы наблюдаем похожий эффект.

**frame315** - Asp102 (отворачивается), **frame315** - Thr216 (--> His)  
**frame527** - Thr216 (--> down), HO Asp102 все еще отвернут  
*Больше аспартат и треонин не возвращаются*

В данной системе (neu), в сравнении с предыдущей, chg, HisD60 обращен вверх большее количество фреймов траектории. Примечательно также, что аспартат больше не возвращается в стартовое состояние.

**#9 - 02.12.2021 23:23 - July Belyaeva**

Я могу быть не права в своих идеях, но обрати, пожалуйста, внимание, когда будешь читать на статью:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0116737> (Figure 2, S1 Entrance Frame). В структуре 1bml S1 Entrance Frame соответствуют остатки под номерами 760 - 765. В целом, prod.gro (neu) по расположению этого участка похожа на активную форму (треонин 216 прилегает к S1 Entrance Frame).

Прикрепляю PyMol-сессию (сопоставление neu, 1bml ~ апо-форма плазмиды, в комплексе со стрептокиназой, 4dva - апо-форма uPA, активная форма, prod - результат 200-нс MD-симуляции neu). Не вижу крупных различий (не говоря об остатках каталитической триады).

**#10 - 02.12.2021 23:37 - July Belyaeva**

- File strucs\_superimposition.pse added

**#11 - 03.12.2021 16:33 - Alexander Zlobin**

По поводу траекторий

Исходно положение протонов в серине 193 и тирозине 231 неверное (в em\_w.gro). Из-за этого 193 меняет конформацию, толкает 139, он толкает злосчастный треонин 216. Это может быть причиной проблем с этим треонином. Это все происходит за эквilibрацию, перед продакшном. Переделай, пожалуйста, em\_w.gro, и дай мне их посмотреть и утвердить. Потом запустим эквilibрацию, и ее результаты тоже надо сначала посмотреть, дать мне, и только потом продакшн.

**Files**

---

prep.pse	5.7 MB	30.11.2021	July Belyaeva
strucs_superimposition.pse	3.79 MB	02.12.2021	July Belyaeva