Плазмин - Project #455
Гидролиз-активация плазмина

11.10.2021 17:28 - Alexander Zlobin

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

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 H-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 первые резы, 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 поделать динамики этой системы подольше (скажем, 500 нс) и в повторностях, поначалу игнорируя эти неприятности с каталитическим серином. Сделать то же самое для системы neu.

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-PN4gFy3fcam1stPUnRUdZUDGlOEq1S8AuYUg/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 NH3+ - хвоста).

После 400 нс MD-симуляции ничего примечательного не произошло. Тогда они начали делать aMD (accelerated MD). В этом случае им удавалось наблюдать событие вставки NH3+ - конца, сопровождающееся вытеснением воды из активационного кармана и образованием солевого мостика Asp - Ile. Структура фермента, включая высококонсервативный сайт Ca2+, была стабильной во время моделирования. *Я не написала, что для старта использовалась и другая структура - 1TGS, в ней с аспартатом 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 NH3+-концом и Lys:
Солевой мостик Lys156 - Asp194 формировался и разрывался несколько раз, как в ходе классической, так и в ходе aMD-симуляции, давай возможность предполагать, что барьер, разделяющий эти две конфигурации (связанную и несвязанную) - невелик. Результаты показывают, что Lys156 не так стабильно держится в активационном кармане, как NH3+ - конец, ибо последний оставался в кармашке на протяжении всей MD и aMD-симуляции.

Тут, конечно, может иметь место проблема стартового состояния, факт того, что NH3+ - 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:

a) 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)
b) 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 хи2 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). Позжу 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 эквилибрацию, "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" наверх).
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), НО Asp102 все еще отвернут
frame378 - Thr216 (--> His), НО 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), НО Asp102 все еще отвернут
frame1087 - Thr216 (--> His), НО Asp102 все еще отвернут
frame1152 - Thr216 (--> down), НО Asp102 все еще отвернут
frame1929 - Thr216 (--> His), НО Asp102 все еще отвернут
frame1935 - Thr216 (--> down), НО 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 наверх)
frame465 - HisD60 (поворачивается обратно вниз)
frame1344 - HisD60 меняет конформацию (загибается наверх)
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), НО Asp102 все еще отвернут
Больше аспартат и треонин не возвращаются

В данной системе (neu), в сравнении с предыдущей, chg, HisD60 обращен наверх большее количестве 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 Entarnce Frame).

Прикрепляю PyMol-сессию (сопоставление neu, 1bml ~ апо-форма плазмина, 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 эквилибрацию, перед продакшном. Переделай, пожалуйста, em_w.gro, и дай мне их посмотреть и утвердить. Потом запустим эквилибрацию, 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