

Cel ćwiczenia: Zaprojektowanie modelu kompleksu SRSF6 z topoisomerasą I.

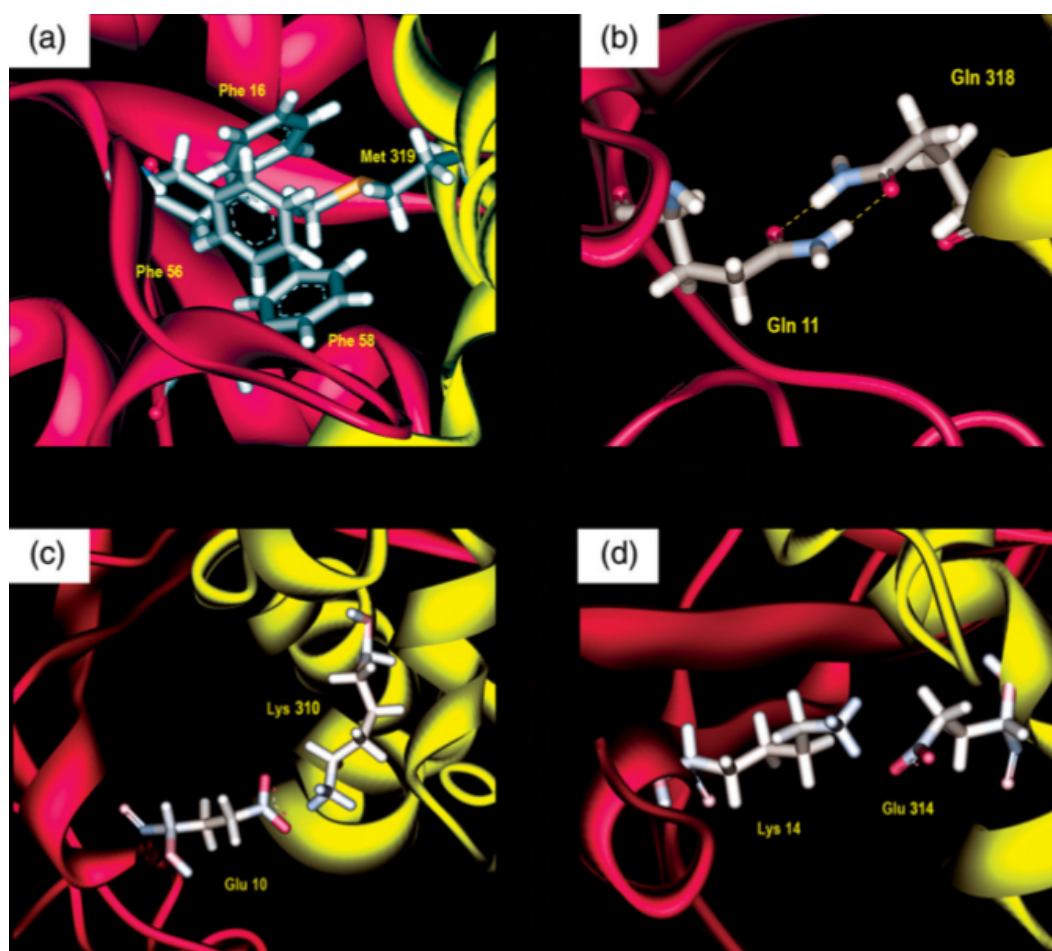
Białko SRSF1 jest złożonym z 248 aminokwasów białkiem SR biorącym udział w splicingu pre-mRNA. Jest ono homologiem SRSF6. Na Rysunku 1 przedstawiliśmy wyniki porównania sekwencji SRSF1 i SRSF6.

1

Tabela 1: Zakresy sekwencji odpowiadające różnym elementom strukturalnym białek hnRNP A1, SRSF1 i SRSF6.

| Element strukturalny | hnRNP A1 | SRSF1 | SRSF6 |
|----------------------|----------|---------|---------|
| N-koniec | 1-13 | 1-15 | |
| RRM1 | 14-97 | 16-91 | 1-72 |
| Łącznik | 98-104 | 92-120 | 73-109 |
| RRM2 | 105-184 | 121-195 | 110-183 |
| C-koniec | 185-372 | 196-248 | 184-344 |

W pracy [3] zaproponowano strukturę kompleksu hnRNP A1 z topoI. Według tej pracy hnRNP A1 oddziałuje z kapem topoI poprzez swoją domenę RRM1. Zaproponowane w [3] oddziaływania przedstawiono na Rysunku 2.



Rysunek 2: Oddziaływania stabilizujące kompleks topoI (na żółto) z hnRNP A1 (na różowo) z [3]. (a) Hydrofobowa kieszeń złożona z PHE16, PHE56 i PHE58 z hnRNP A1 i M319 z topoI. (b) Wiązanie wodorowe pomiędzy GLN11 z hnRNP A1 i GLN318 z topoI. (c) Wiązanie jonowe GLU10 z hnRNP A1 i LYS310 z topoI. (d) Wiązanie jonowe LYS14 z hnRNP A1 i GLU314 z topoI.

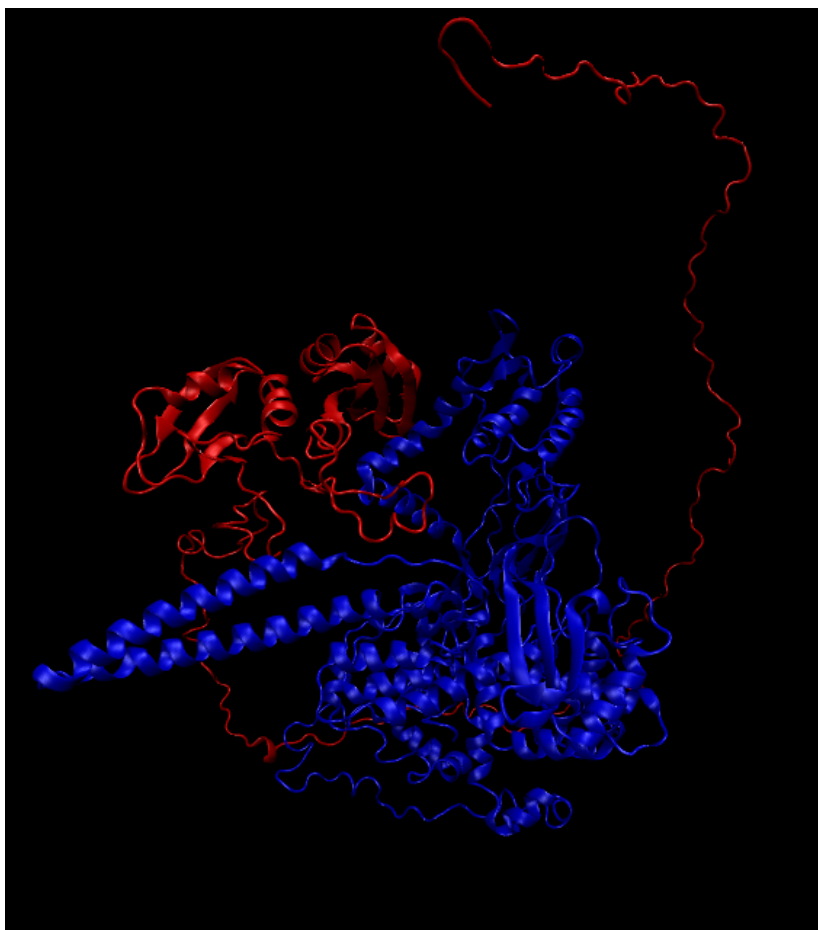
Według [2] SRSF1 wiąże się z capem topoI przy użyciu domeny RRM1 oraz z domeną N-kończową topoI przy użyciu C-końcowej domeny RS.

1.1 Model SRSF6

Pobraliśmy z bazy PDB plik o kodzie 1X4A zawierający strukturę białka SRSF1. Strukturę domeny RRM2 wraz z łącznikiem z pracy [2] oraz strukturę białka hnRNP A1 z pracy [3] udostępniła nam osoba prowadząca ćwiczenia. Zastosowaliśmy modelowanie homologiczne w celu otrzymania domen RRM1 i RRM2 białka SRSF6 używając powyższych domen SRSF1 jako szablonów oraz korzystając z wyników uliniowienia SRSF1 i SRSF6. Wykorzystaliśmy w tym celu program Moe, używając pola siłowego Amber10. Otrzymane domeny SRSF6 ułożyliśmy przestrzennie podobnie jak w strukturze hnRNP A1. W kolejnym kroku dobudowaliśmy brakujące w łączniku aminokwasy: prolinę na pozycji 73 i argininę na pozycji 74. Następnie wiązaniem peptydowym połączyliśmy łącznik z domeną RRM1. Dodaliśmy też do budowanej struktury SRSF6 brakujące 111 aminokwasów C-końca. W kolejnym kroku zwinęliśmy C-koniec i przesunęliśmy łącznik za pomocą sterowanej dynamiki molekularnej w programie Yasara, używając pola siłowego YAmber3, komórki elementarnej typu wall której ściany były odległe o 5 Å od najbardziej wysuniętych atomów układu, bez wody, oraz z zamrożonymi domenami. Następnie wykonaliśmy 3-minutową optymalizację energii układu w Yasarze, wykorzystując pole siłowe Yamber 3, komórkę elementarną jak wyżej tylko typu periodic a nie wall, z wodą, w temperaturze 36,6 stopni Celsjusza i pod ciśnieniem 1 bar. Przy optymalizacji odmrożone były tylko łańcuchy boczne aminokwasów, C-koniec i łącznik.

1.2 Model kompleksu

Przy opracowywaniu modelu kompleksu topoI z SRSF6 przyjęliśmy założenie że cap topoI oddziałuje z domeną RRM1 SRSF6 podobnie jak z domeną RRM1 hnRNP A1 w pracy [3]. Od osoby prowadzącej ćwiczenia dostaliśmy strukturę topoI oraz kompleksu topoI z hnRNP A1 z [3]. Ustawiliśmy kompleks złożony ze struktury SRSF6 z poprzedniej sekcji i topoI aby otrzymać podobne oddziaływanie capu topoI z domeną RRM1 jak w kompleksie topoI z hnRNP A1 z [3]. C-koniec SRSF6 ustawiliśmy tak żeby znajdował się obok topoI, blisko jej domeny N-końcowej (obejmującej jej aminokwasy od 1 do 214). Następnie dokonaliśmy optymalizacji kompleksu topoI z SRSF6 używając parametrów jak przy optymalizacji SRSF6. Zoptymalizowany kompleks przedstawiliśmy na Rysunku 3.

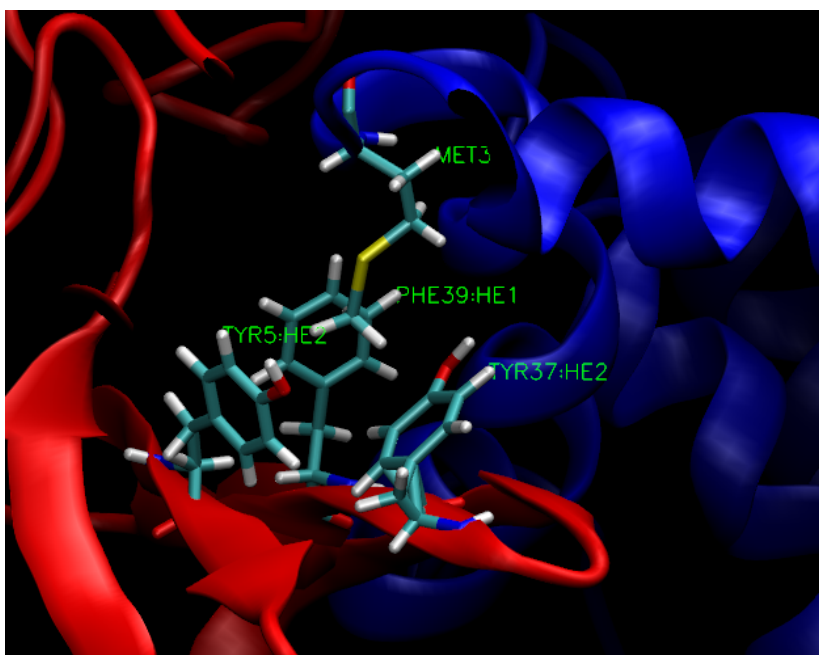


Rysunek 3: Kompleks SRSF6 (na czerwono) i topoI (na niebiesko) po optymalizacji.

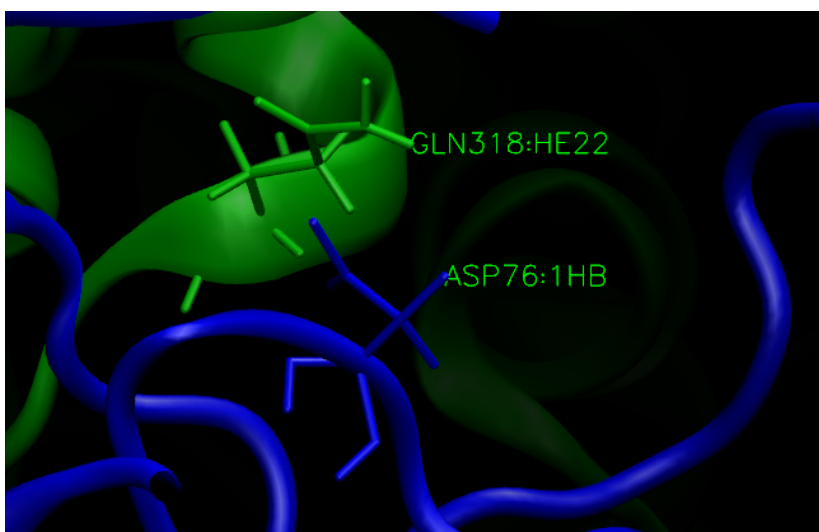
W zoptymalizowanym kompleksie znaleźliśmy następujące oddziaływania będące odpowiednikami oddziaływań topoI z hnRNP A1 z Rysunku 2:

- oddziaływanie hydrofobowe aminokwasów TYR5, TYR37 i PHE39 z SRSF6 i MET319 z topoI, będące odpowiednikiem oddziaływania hydrofobowego aminokwasów PHE16, PHE56 i PHE58 z hnRNP A1 i M319 z topoI,
- wiązanie wodorowe ASP76 z SRSF6 i GLN318 z topoI będące odpowiednikiem wiązania wodorowego GLN11 z hnRNP A1 i GLN318 z topoI,
- wiązanie jonowe GLU41 z SRSF6 i LYS310 z topoI, będące odpowiednikiem wiązania jonowego GLU10 z hnRNP A1 i LYS310 z topoI,
- wiązanie jonowe ARG3 z SRSF6 i GLU314 z topoI, będące odpowiednikiem wiązania jonowego LYS14 z hnRNP A1 i GLU314 z topoI.

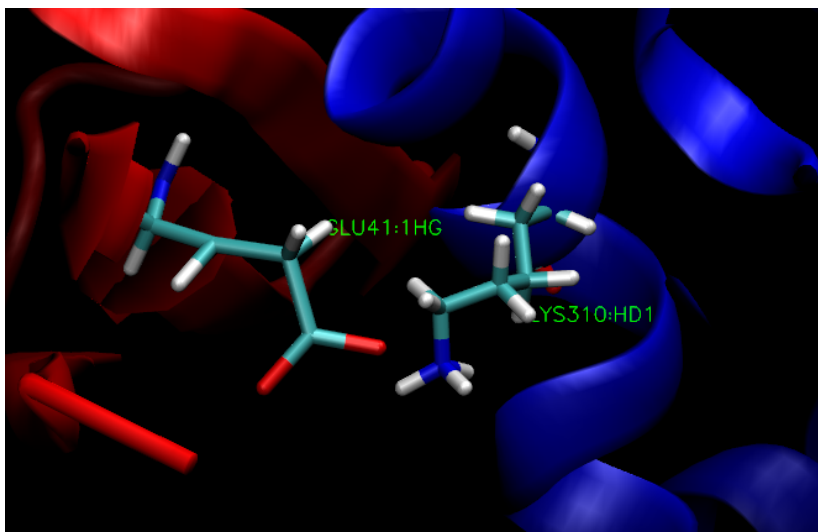
Znalezione oddziaływania przedstawiliśmy na rysunkach 4, 5, 6 i 7.



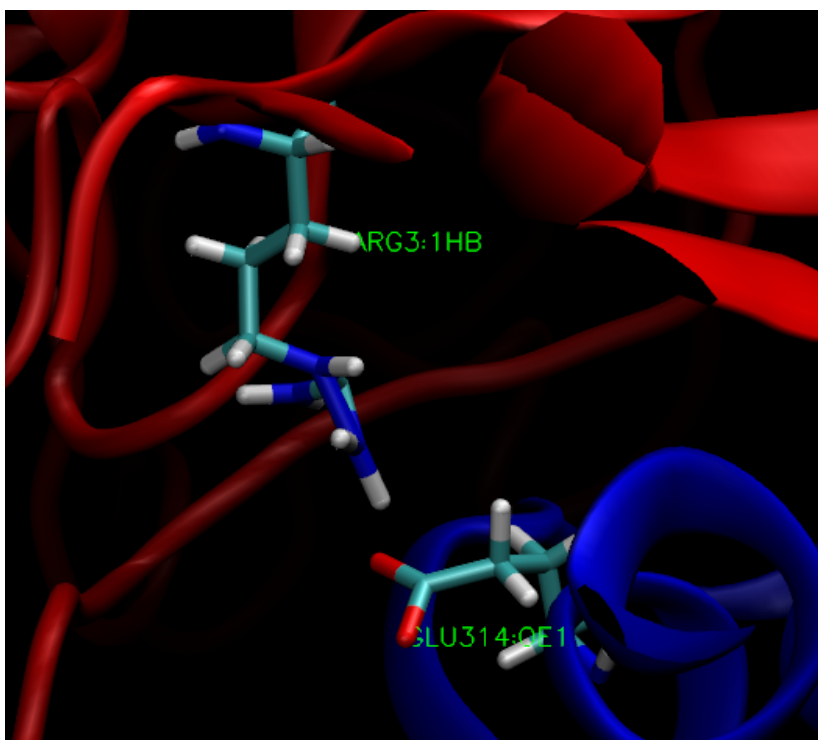
Rysunek 4: Oddziaływanie hydrofobowe aminokwasów TYR5, TYR37 i PHE39 z SRSF6 (na czerwono) i MET319 z topoI (na niebiesko) po optymalizacji.



Rysunek 5: Wiązanie wodorowe ASP76 z SRSF6 (na niebiesko) i GLN318 z topoI (na zielono) po optymalizacji.



Rysunek 6: Wiązanie jonowe GLU41 z SRSF6 (na czerwono) i LYS310 z topoI (na niebiesko) po optymalizacji.



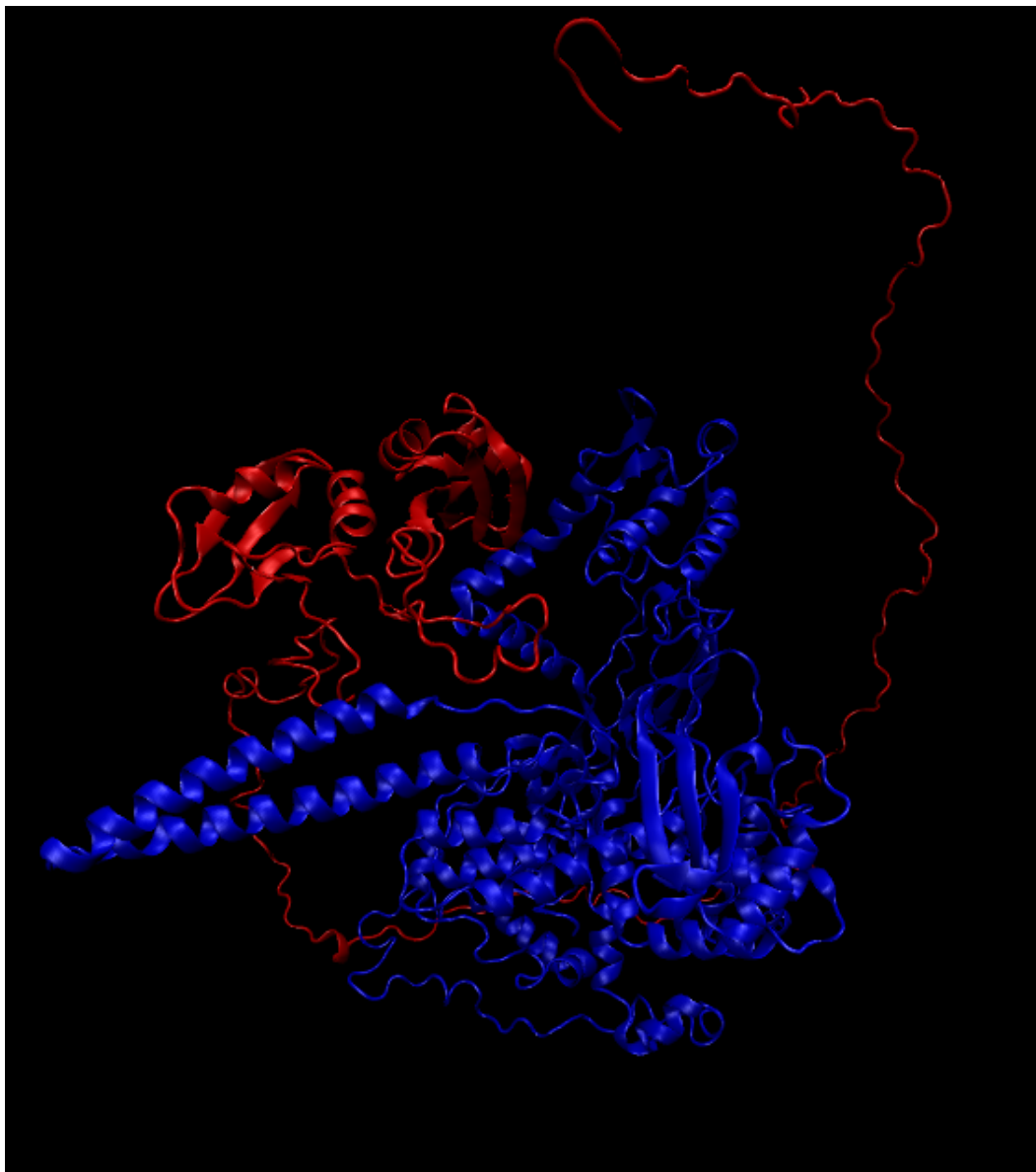
Rysunek 7: Wiązanie jonowe ARG3 z SRSF6 (na czerwono) i GLU314 z topoI (na niebiesko) po optymalizacji.

W celu otrzymania warunków zbliżonych do rzeczywistych, do zoptymalizowanego kompleksu dodaliśmy 108 466 cząsteczek H_2O , 51 jonów Na^+ i 139 jonów Cl^- , uzyskując siłę jonową $0.05 [mol/dm^3]$ i neutralizację ładunku w układzie. Tak przygotowany układ został poddany trójstopniowej dynamice molekularnej w polu siłowym CHARMM27, złożonej z następujących etapów.

1. Minimalizacja + dynamika, w których białka były zamrożone a woda i przeciwjony były odmrożone, co miało na celu ekwilibrację wody i jonów.
2. Minimalizacja + dynamika - zamrożony łańcuch główny i oddziaływania wymienione w Sekcji 1.2. Celem tego etapu było umożliwienie ekwilibracji grup bocznych i otoczenia unikając przy tym rozerwania się wiązań i rozpadu kompleksu.
3. Wykonaliśmy minimalizację aż do uzyskania gradientu około 0.017. Następnie zrobiliśmy dynamikę z rozmrożonym całym układem.

Wszystkie dynamiki zostały przeprowadzone z krokiem czasowym 1 fs. Czas trwania pierwszej i drugiej dynamiki wynosił 0.02 ns natomiast trzeciej 3 ns. Podczas każdej z minimalizacji temperatura wynosiła 50 K, zaś podczas każdej dynamiki 310 K. Komórka elementarna miała wymiary 158.76 Å na 147.50 Å na 152.85 Å, a cutoff wynosił 12.

Na Rysunku 12 przedstawiliśmy strukturę kompleksu po dynamice.



Rysunek 8: Kompleks SRFS6 z topoI po dynamice molekularnej.

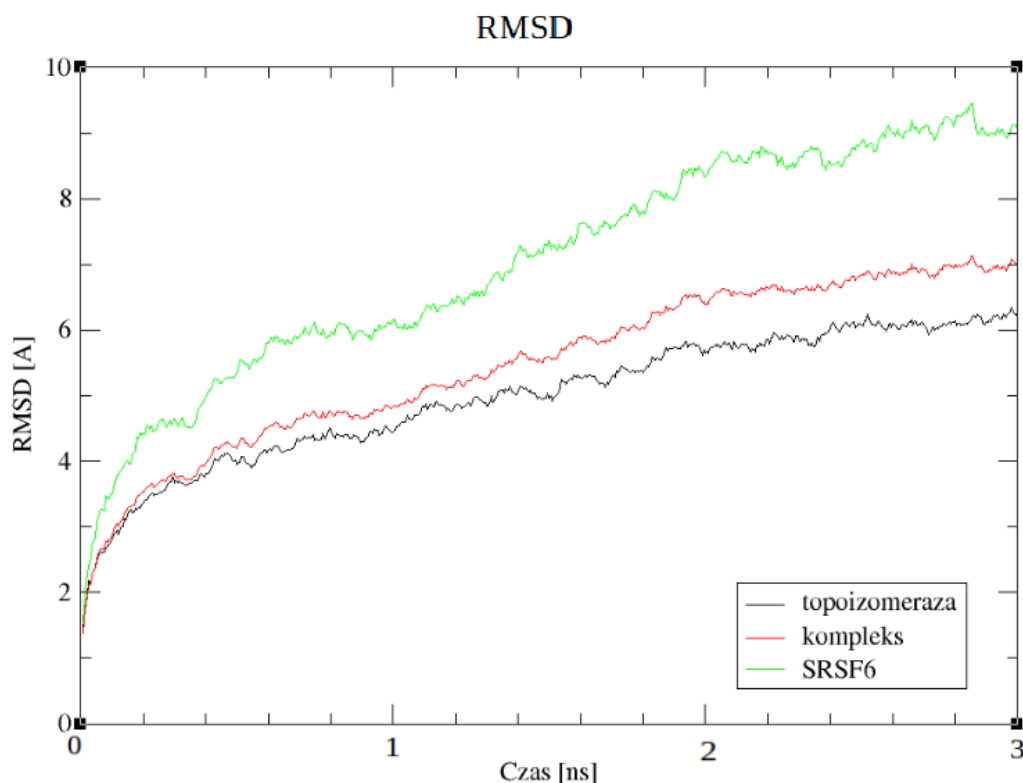
2 Analiza otrzymanych wyników z dynamiki molekularnej

W tej sekcji analizujemy wyniki dynamiki molekularnej z trzeciego etapu z poprzedniej sekcji.

2.1 Analiza stabilności układu

2.1.1 Stabilność RMSD

Na Wykresie 1 przedstawiliśmy zależność od czasu RMSD struktury kompleksu SRSF6 i topoI względem jego struktury na początku dynamiki, oraz podobnie dla struktur tych białek oddzielnie.

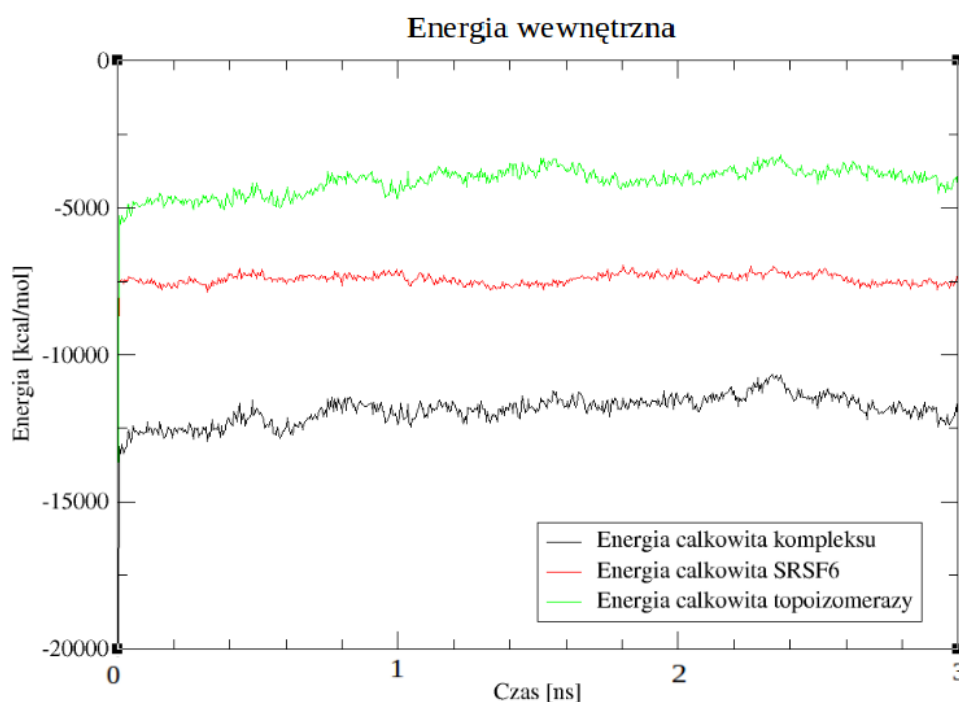


Wykres 1: Zależność od czasu RMSD kompleksu SRSF6 i topoI oraz tych białek oddzielnie.

RMSD dla wszystkich struktur zwiększa się z czasem, osiągając po 3 ns wartości 6.99 Å dla kompleksu, 6.20 Å dla topoI i 9.09 Å dla SRSF6. W okolicy 2 ns zaczyna się bardzo powolny wzrost RMSD dla wszystkich struktur, np. między 2 a 3 ns RMSD kompleksu rośnie tylko o 0.60 Å, topoI o 0.56 Å, a SRSF6 o 0.76 Å, podczas gdy między 1 a 2 ns są to wzrosty aż o 1.55 Å, 1.20 Å i 2.17 Å odpowiednio. Mimo że wzrost RMSD jest coraz wolniejszy, jest ono niestabilne i dalsza dynamika jest potrzebna żeby ustalić czy ustabilizuje się. Zależność RMSD od czasu kompleksu jest bliższa zależności od czasu RMSD topoI niż SRSF6, skąd można wywnioskować że topoI ma większy wpływ na RMSD kompleksu niż SRSF6.

2.1.2 Stabilność energii

Na Wykresie 2 przedstawiliśmy zależność od czasu w dynamice molekularnej całkowitej energii wewnętrznej struktury kompleksu SRSF6 i topoI oraz tych białek oddzielnie.



Wykres 2: Zależność od czasu całkowitej energii wewnętrznej kompleksu SRSF6 i topoI oraz tych białek oddzielnie.

Po okresie spowalniającego wzrostu, w pierwszej nanosekundzie dynamiki energie wewnętrzne topoI i kompleksu na Wykresie 2 stabilizują się, natomiast energia wewnętrzna SRSF6 wydaje się stabilna w czasie już po 0.05 ns dynamiki. W okresie od 1 ns do 3 ns średnia energia wewnętrzna kompleksu wynosi -11669 [kcal/mol], SRSF6 -7420 [kcal/mol], a topoI -3875 [kcal/mol]. W okresie od 0.05 ns do 3 ns dynamiki średnia energia SRSF6 wynosi -7421 [kcal/mol], a więc niemal tyle co w ostatnich dwóch sekundach dynamiki. Zależność energii wewnętrznej od czasu kompleksu bardziej przypomina zależność od czasu energii wewnętrznej topoI niż SRSF6, skąd można wywnioskować że topoI ma większy wpływ na energię wewnętrzną kompleksu niż SRSF6.

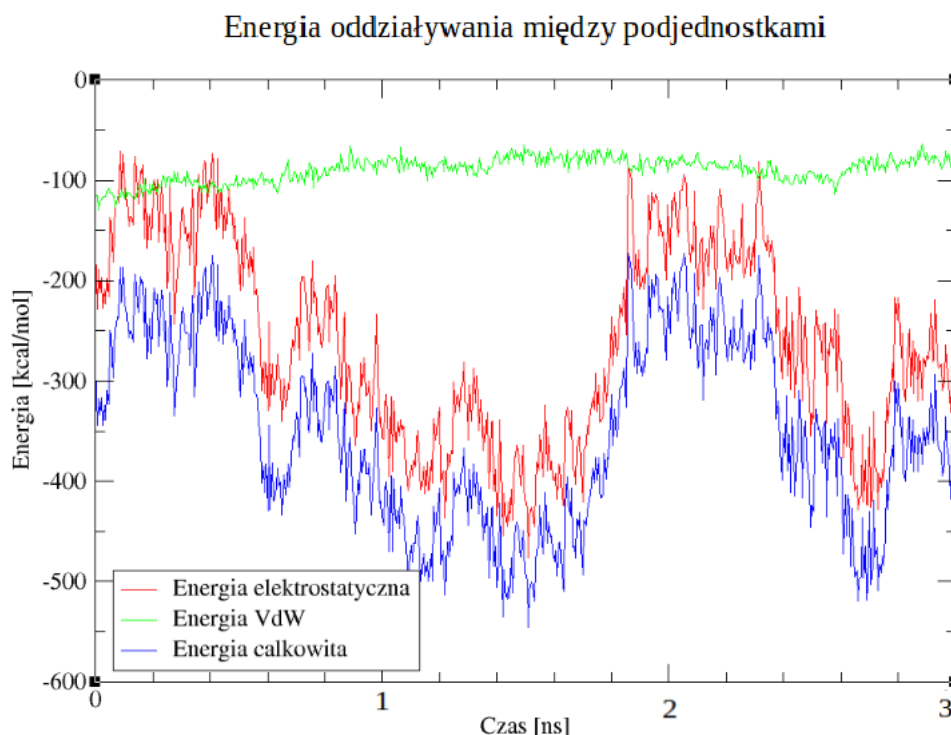
2.1.3 Wnioski

Energie wewnętrzne wszystkich struktur stabilizują się z czasem ale RMSD zwiększa się przez cały okres dynamiki, w związku z czym układ nie jest całkowicie stabilny. Dalsza dynamika jest potrzebna żeby stwierdzić czy układ ustabilizuje się. Zarówno dla zależności energii wewnętrznej jak i RMSD od czasu występuje większe podobieństwo tych zależności dla kompleksu i dla topoI niż dla SRSF6, skąd możemy wnioskować że topoI ma większy wpływ na energię wewnętrzną i RMSD kompleksu niż SRSF6.

2.2 Analiza energii oddziaływania białek w kompleksie

2.2.1 Analiza

Na Wykresie 3 przedstawiliśmy zależność od czasu energii oddziaływań elektrostycznych, Van der Waalsa (VdW) i całkowitej energii oddziaływań między SRSF6 i topoI.



Wykres 3: Wykres energii oddziaływań elektrostatycznych, Van der Waalsa i całkowitej energii oddziaływań między SRSF6 i topoI w funkcji czasu.

Energia oddziaływań VdW najpierw rośnie z -116.23 [kcal/mol] na początku symulacji do -66.15 [kcal/mol] w 0.89 nanosekundzie od początku symulacji, następnie jest stabilna między 0.89 a 2 ns ze średnią -81.47 [kcal/mol], po czym spada do -113.73 [kcal/mol] w 2.58 ns dynamiki i znowu rośnie do -78.9154 [kcal/mol] w 3 ns. Energie oddziaływań elektrostatycznych i energia całkowita podlegają dużym i podobnym co do kształtu wahaniom w przedziale od -545 do -173 [kcal/mol] dla energii całkowitej i od -476 do -71 [kcal/mol] dla energii elektrostatycznej.

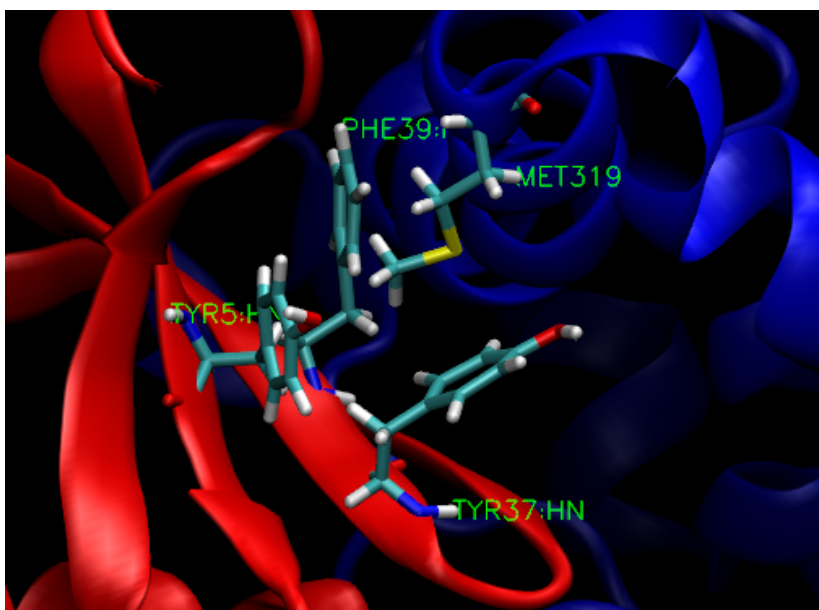
2.2.2 Wnioski

Zarówno energia oddziaływań VdW, elektrostatycznych, jak i całkowita energia oddziaływań SRSF6 i topoI wykazywała wahania w trakcie symulacji. Zatem energia oddziaływań białek w kompleksie jest niestabilna. Z tego że energia całkowita podlega podobnym wahaniom jak oddziaływania elektrostatyczne i ich wartości są bliskie można wywnioskować że oddziaływania elektrostatyczne mają dużo większy wpływ na energię całkowitą niż oddziaływania VdW.

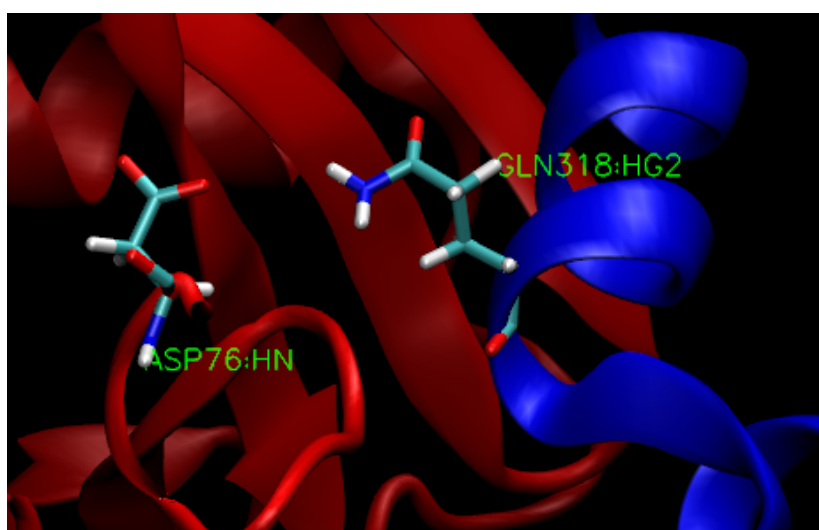
2.3 Analiza ważnych oddziaływań

2.3.1 Analiza

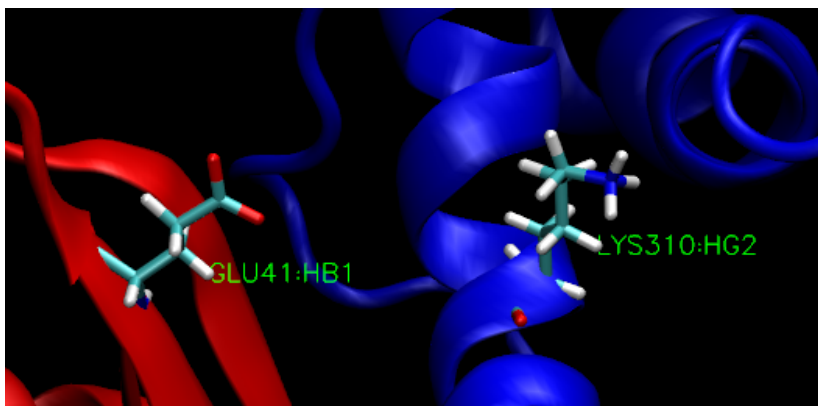
Na poniższych rysunkach 9, 10, 11, i 12 przedstawiliśmy struktury po dynamice molekularnej miejsc oddziaływań topoI z SRSF6 wymienionych w Sekcji 1.2.



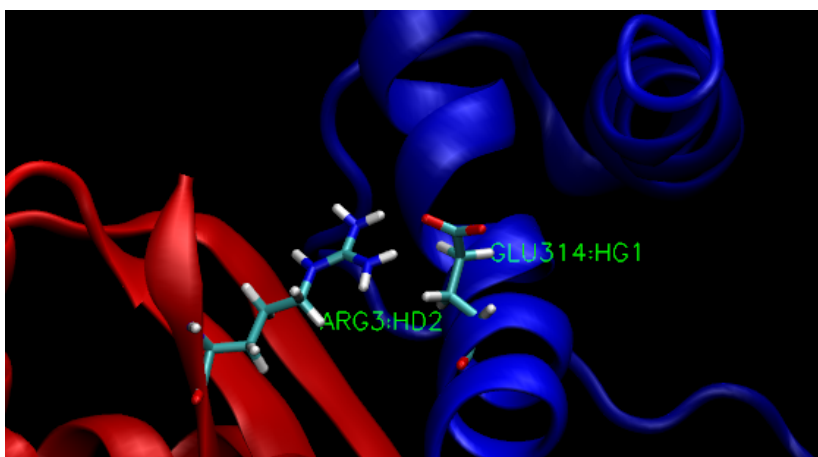
Rysunek 9: Oddziaływanie hydrofobowe aminokwasów TYR5, TYR37 i PHE39 z SRSF6 (na czerwono) i MET319 z topoI (na niebiesko) po dynamice molekularnej.



Rysunek 10: Oddziaływanie wodorowe ASP76 z SRSF6 (na czerwono) i GLN318 z topoI (na niebiesko) po dynamice molekularnej.



Rysunek 11: Oddziaływanie jonowe GLU41 z SRSF6 (na czerwono) i LYS310 z topoI (na niebiesko) po dynamice molekularnej.



Rysunek 12: Oddziaływanie jonowe ARG3 z SRSF6 (na czerwono) i GLU314 z topoI (na niebiesko) po dynamice molekularnej.

Jak widać z Rysunku 4 oddziaływania hydrofobowego aminokwasów TYR5, TYR37 i PHE39 z SRSF6 i MET319 z topoI po optymalizacji i i Rysunku 9 tego oddziaływania po dynamice, wiązanie to zachowało się mimo lekkiego zwiększenia się odległości aminokwasów TYR5, TYR37 i PHE39 SRSF6 od aminokwasu MET319 topoI. Natomiast struktura kieszeni SRSF6 nie została w pełni zachowana z powodu rotacji pierścienia fenyloalaniny 39 SRSF6. Z dokładnej obserwacji klatek dynamiki molekularnej można wywnioskować że rotacja ta nastąpiła około 0.12 ns po rozpoczęciu dynamiki i utrzymała się do końca dynamiki. Z rysunków 5 i 10 oddziaływania wodorowego ASP76 z SRSF6 i GLN318 z topoI oraz rysunków 6 i 11 oddziaływania jonowego GLU41 z SRSF6 i LYS310 z topoI widać że oddziaływania te nie zachowały się. Z rysunków 7 i 12 widać że wiązanie jonowe ARG3 z SRSF6 i GLU314 z topoI zachowało się.

2.3.2 Wnioski

Podsumowując, po dynamice zachowało się jedno oddziaływanie jonowe i jedno hydrofobowe, natomiast jedno oddziaływanie wodorowe i jonowe rozpadło się. Dalsza dynamika molekularna pozwoliłaby ocenić czy zachowane oddziaływania są trwałe. Wspomniane w Sekcji 2.1.1

wzrost RMSD kompleksu może mieć związek z rozpadem części wiązań i oddalaniem się białek w sąsiedztwie tych oddziaływań. Wspomniany w Sekcji 2.2.1 początkowy wzrost energii oddziaływań VdW może mieć związek ze omawianą wyżej rotacją PHE39 z SRSF6 na początku symulacji, która zaburzyła strukturę kieszeni złożonej z aminokwasów TYR5, TYR37 i PHE39 z SRSF6 oddziałujących hydrofobowo z MET319 z topoI.

3 Wnioski

Topoizomeraza ma większy wpływ na energię wewnętrzną i RMSD kompleksu niż SRSF6 a oddziaływania elektrostatyczne mają większy wpływ na całkowitą energię oddziaływań niż oddziaływania VdW. Energia wewnętrzna SRSF1, topoI, i kompleksu stabilizuje się, ale RMSD i energie oddziaływań nie są stabilne, w związku z czym nie można uznać układu za stabilny.

4 Podsumowanie

Podsumowując, układ nie jest w pełni stabilny i nie udało się zrealizować celu stworzenia kompleksu SRSF6 z topoI o podobnych oddziaływaniach jak w kompleksie 4nRNP A1 z topoI z [3]. Powodem może być nie dość staranne przygotowanie struktur do dynamiki. Ponieważ RMSD kompleksu i poszczególnych domen rośnie pod koniec zdecydowanie wolniej niż na początku, istnieje szansa że po dłuższej symulacji możemy dostać stabilny układ. Ciekawe byłoby sprawdzenie czy rzeczywiście tak się stanie i czy przy dalszej dynamice nastąpiłoby odtworzenie części z utraconych wiązań.

Literatura

- [1] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q13247>.
- [2] T. Ishikawa et al. Activities of Topoisomerase I in Its Complex with SRSF1. *Biochemistry*, 51(8):1803–16, 2012.
- [3] A. M. Trzcinska-Daneluti et al. RRM Proteins Interacting with the Cap Region of Topoisomerase I. *J. Mol. Biol.*, 369:1098–1112, 2007.