

水介导的通讯路径对脂肪酶热稳定性的影响

闫蓉^{1,2}, 丁彦蕊^{*1}

(1. 江南大学 理学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏省媒体设计与软件技术重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为研究残基和水之间的信号传递对蛋白质热稳定性的影响, 以野生型脂肪酶(WTL)及其突变体(6B)在不同温度下的分子动力学模拟轨迹为基础, 构建了以残基和水为节点, 残基-残基及残基-水的相互作用为边的残基-残基和残基-水相互作用网络。通过 Dijkstra 算法计算网络中节点之间的最短路径, 结果表明, 300 K 时, WTL 和 6B 的 α B 与 β 4 之间的 loop 和 α B 上的残基频繁与水通讯, 降低了该区域的柔性。400 K 时, WTL 仅仅加强了 α C 内部的连接, 而 6B 中 β 7 与 β 8 之间的 loop、 α A 以及最长的 loop 之间相互连接并且与水保持稳定通讯, 从而稳定脂肪酶的热稳定性。此外, 6B 的突变点 A20E 在突变之后更容易与水形成稳定的氢键作用, 突变使脂肪酶热稳定性增强。本研究为理性设计提高蛋白质耐热性提供了理论基础。

关键词: 脂肪酶; 热稳定性; Dijkstra 算法; 最短路径

中图分类号: Q 71 文章编号: 1673-1689(2021)05-0028-09 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.05.004

Effect of Water-Mediated Communication Path on Thermal Stability of Lipase

LYU Rong^{1,2}, DING Yanrui^{*1}

(1. School of Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Media Design and Software Technology, Wuxi 214122, China)

Abstract: To study the effect of signal transmission between residues and water on protein thermal stability, the Residue-Residue and Residue-Water interaction networks were constructed based on the trajectories obtained by molecular dynamics simulation of wild-type lipase (WTL) and its mutant (6B) at different temperatures, with residues and water as nodes and residue-residue and residue-water interactions as edges. The Dijkstra algorithm was used to calculate the shortest path between nodes in the network. The results showed that at 300 K, the residues on loop between α B and β 4 and α B in WTL and 6B frequently communicated with water, which reduced the flexibility of this region. At 400 K, WTL only strengthened the internal connection of α C, while in 6B, the loop between β 7 and β 8, α A and the longest loop were connected to each other and maintained stable

收稿日期: 2020-03-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(21541006)。

* 通信作者: 丁彦蕊(1976—), 女, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事智能计算与复杂网络、生物信息学研究。

E-mail: yr_ding@jiangnan.edu.cn

communication with water, thus stabilizing the thermal stability of lipase. In addition, the mutation point A20E in 6B was more likely to form stable hydrogen bond with water after the mutation, and the mutation increased the thermal stability of lipase. Thus, this study can provide a theoretical basis for rational design to improve the heat resistance of protein.

Keywords: lipase, thermal stability, Dijkstra algorithm, shortest path

脂肪酶广泛存在于动物、植物和微生物中,能催化水解、酯化、酯交换、醇解、酸解等反应,并且能在有机溶剂、离子液体等非水相中催化反应。脂肪酶在催化反应中不需要辅酶,催化效率也较高,所需反应条件温和,有利于降低生产成本。因此,脂肪酶在洗涤剂、食品、造纸、油脂、化妆品、制药等多个工业领域中有广泛应用^[1-2]。高温下保持酶的功能活性和结构完整性是许多蛋白质生物技术、食品加工和商业工业中应用的理想标准,所以对脂肪酶耐热性的研究是工业生产的迫切需求。

水作为生物分子的常见溶剂,在调节蛋白质的结构、功能和生物活性方面发挥着重要作用^[3-6]。蛋白质和水之间的相互作用对蛋白质结构、动力学和功能至关重要^[6-8],也会影响蛋白质的热稳定性^[9-11]。耐热的蛋白质在蛋白质-水界面显示出更丰富的微观形态和更高的亲水性^[11-12]。目前已有一些实验的方法及计算机模拟的方法可供研究蛋白质和水之间的关系,有研究发现蛋白质会扰乱其水合壳中的水的动力学^[7],而水分子除了调节蛋白质动力学^[13],还与蛋白质形成氢键网络直接参与蛋白质功能作用^[14],并介导蛋白质-蛋白质之间相互作用^[15-18]。然而,蛋白质-水之间的耦合动力学并不完全清楚。因此,了解水在生物分子结构和动力学以及从复杂网络中最短路径的角度研究蛋白质和水之间的信号传递对于揭示其对蛋白质功能的影响至关重要。

复杂网络的研究和应用目前已渗入到社会学、生物学以及计算机科学等领域,网络的研究具有重要的理论和实际应用的价值^[19]。蛋白质的三维结构可通过转换成网络来体现,并且蛋白质中的残基之间和残基-水之间存在相互作用,因此可以残基、水为节点,残基之间及残基-水的相互作用为边构成残基-残基和残基-水网络(简称残基-水全网络)。将复杂网络中最短路径的计算应用在蛋白质网络中具有重要的作用。Zhang等利用最短路径找出与脉络膜新生血管(CNV)相关的候选基因,为治疗CNV提供了新的见解^[20]。Papaleo等通过详细分析酶

中的最短路径,从而可更清楚了解酶中残基之间的通讯^[21]。此外,通过计算蛋白质相互作用网络中的最短路径,可了解网络的性质并且识别关键残基^[22]。最短路径选择就是使用最优化的理论方法,搜索两个节点之间多条通路中的最短路径。由于问题以及网络的多样性,求解最短路径的算法也有很多。其中,经典的最短路径算法主要有Dijkstra算法^[23]、Floyd-Warshall算法^[24]、Bellman-Ford算法^[25]。本研究使用Dijkstra算法来挖掘脂肪酶残基-水全网络中的最短路径,以获得脂肪酶中残基和水之间信号传递的动态变化。

以野生型脂肪酶及其突变体6B在2个温度(300 K和400 K)下通过300 ns的长时间分子动力学模拟为研究对象,首先以残基和水为节点,残基-残基及残基-水的相互作用为边,构建脂肪酶残基-水全网络。然后使用Dijkstra算法对脂肪酶残基-水全网络进行最短路径识别,分析最短路径与脂肪酶耐热性的关系,从而进一步分析研究水在脂肪酶最短路径中的作用以及残基和水之间信号传递的动态变化。

1 材料与方法

1.1 脂肪酶的分子动力学模拟

本研究中的研究对象为野生型脂肪酶(WTL, PDB code: 1I6W, T_m : 56 °C)^[26]及其突变体6B(PDB code: 3QMM, T_m : 78.2 °C)^[27]。6B是印度研究组Rao等利用多轮体外进化获得的野生型枯草芽孢杆菌脂肪酶突变体,共12个突变点(A15S、F17S、A20E、N89Y、G111D、L114P、A132D、M134E、M137P、I157M、S163P、N166Y)^[27]。野生型WTL和突变体6B的三维结构如图1所示,其中红色区域是 α 螺旋,黄色区域是 β -折叠,绿色的区域是loop,蓝色的区域是6B中的突变点。

通过Amber软件包^[28]在300 K和400 K下分别执行了300 ns的长时间分子动力学模拟。WTL和6B在包含17 765和16 993个TIP3P水分子的

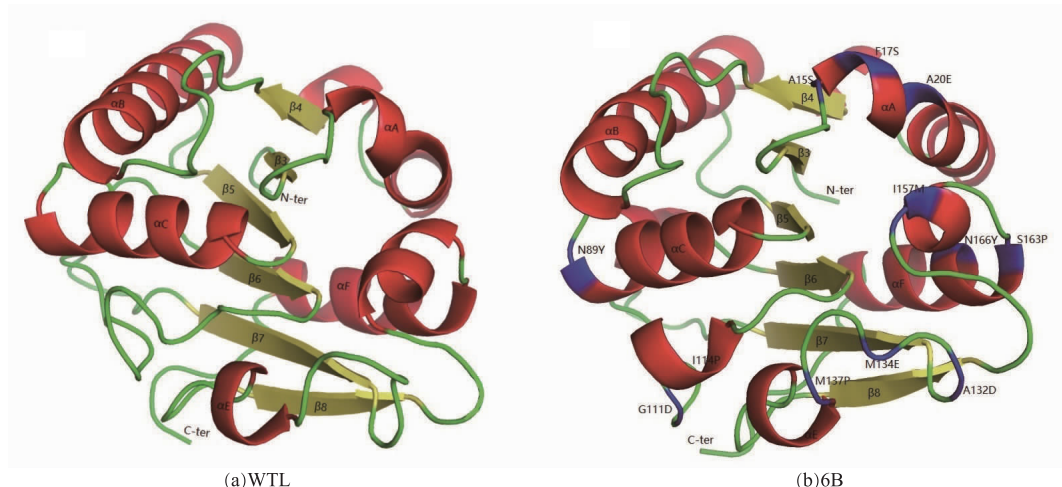


图 1 WTL 和 6B 的三维结构

Fig. 1 The three-dimensional structure of WTL and 6B

周期性水盒子中溶解,蛋白质表面与盒子边缘的距离为 2 nm。分别加入 5 个和 1 个氯离子中和系统,最后系统中分别有 55 996 个原子(WTL)和 53 685 个原子(6B)。

首先,对包含溶剂、氯离子和脂肪酶氢原子的系统进行 10 000 步最小化,再对整个系统进行 10 000 步最小化。在 NVT 系综中将系统加热至 300 K,再使用 NPT 系综进行多步平衡。用 Amber ff99SBildn 力场描述原子相互作用,截止距离设置为 1.2 nm,用 PME 算法^[29]描述静电相互作用和范德华相互作用。通过 SHAKE 算法^[30]来限制所有含氢键的伸缩,设置 2 fs 的时间步长,每 5 000 步保存一次轨迹。

1.2 脂肪酶动态残基-水全网络的构建

以分子动力学模拟得到的 WTL 和 6B 在 300 K 和 400 K 下 300 ns 的运动轨迹为基础构建脂肪酶残基-水全网络。首先用 Ring 2.0^[31]得到残基-残基相互作用的数据,设置不同相互作用的距离阈值分别为氢键 0.35 nm,盐桥 0.35 nm,二硫键 0.4 nm, π - π 堆积 0.7 nm, π -阳离子 0.7 nm,范德华相互作用 0.08 nm。然后用 vmd 软件^[32]得到残基-水相互作用的数据,其中氢键定义为:如果供体和受体原子之间的距离 <0.35 nm,角度偏差 $<30^\circ$,那么它们之间就形成了氢键。接着以残基和水为节点,残基-残基及残基-水相互作用为边,构建脂肪酶残基-水全网络。每一帧的构象编码为一个脂肪酶残基-水全网络,则模拟时间内的所有帧的网络构成时间轴上的动态脂肪酶残基-水全网络。

1.3 Dijkstra 算法计算最短路径

残基和水之间的路径都会随着时间的变化而变化。Dijkstra 算法^[23]可以求得图中一点到其它任一顶点的最短路径。本文使用 Dijkstra 算法对脂肪酶残基-水全网络进行最短路径挖掘,挖掘出残基到水之间的路径,从而进一步了解水对脂肪酶耐热性的影响。残基-水全网络中的边权重是残基之间以及残基-水之间的相互作用的数量,边权重越大,就表明节点之间的连接越强,也就意味着节点之间的传输越快^[33-34]。使用 Dijkstra 算法计算最短路径时,节点之间的距离用边缘权重的倒数来表示^[35]。

Dijkstra 算法的基本思想:假设脂肪酶残基-水全网络 $G=(V,E)$, V 是所有节点的集合, E 是网络中所有边的集合。将 V 分成两个集合 S 和 U ,集合 S 中存储的是已经求出最短路径的节点以及相应的最短路径的长度,集合 U 中存储的是除去 S 中的节点后还没有找到最短路径的节点。最开始的时候 S 中只有一个节点,假设为起点 s (残基或者水分子), U 中节点的路径就是“起点 s 到该节点的路径”。求出 U 中节点的最短路径,找出路径最短的节点,并将这个节点加入集合 S 中,更新 U 中节点和节点对应的路径。接着,再从 U 中找出路径最短的节点,并且将这个节点加入 S 中,更新 U 中的节点和节点对应的路径。重复该操作,直到遍历所有的节点。

Dijkstra 算法求脂肪酶残基-水全网络中最短路径的具体步骤为:

1) 假设 $d[s,k]$ 表示起点 s 到节点 k 的最短路径,

初始化时,集合 S 中只有一个起点 s ,那么可以记作 $S=\{s\}$, $d[s,s]=0$ 。集合 U 中包含除 s 之外的其他节点,假如集合 U 中的节点 u 与起点 s 邻接,那么 $d[s,u]$ 就是节点 u 和起点 s 两点之间的权值,如果 u 和 s 不邻接,那么它们之间的距离为无穷大。

2) 在集合 U 中选出一个离起点 s 最近的节点 u ,把 u 放入到集合 S 中,此时 $d[s,u]$ 就是起点 s 到达节点 u 的最短路径值。同时,将节点 u 从集合 U 中移除。

3) 更新集合 U 中各个节点到起点 s 的值,更新的规则为:将新选入集合 S 中的节点 u 作为所考虑的中心节点,如果从起点 s 到节点 j 的距离(该路径经过节点 u) 小于原来的距离(该路径不经过节点 u),那么更新节点 j 的最短路径值 $d[s,j]$,更新之后的 $d[s,j]$ 值为 $d[s,u]+d[u,j]$ 。如果从起点 s 到节点 j 的距离(该路径经过节点 u) 大于原来的距离(该路径不经过节点 u),那么就保持起点 s 到节点 j 的值 $d[s,j]$ 不变。

4) 重复步骤(2)和(3),直到把所有节点加入集合 S 中时,算法结束。

2 结果与讨论

2.1 最短路径的动态变化

使用 Dijkstra 算法计算出 WTL 和 6B 的残基-水全网络在不同温度(300 K 和 400 K)下所有节点之间的最短路径后,分别统计所有帧网络中残基到水分子之间的路径,然后计算了每一条残基到水分子之间的最短路径在 300 帧里的出现次数,分析最短路径的动态变化。两个节点之间的最短路径会随着时间而变化,如果两个节点之间的最短路径在所有时间帧中的出现次数>270(占比>90%),认为这个路径是稳定的路径,并且出现次数越高,就说明这个路径越稳定。

不同温度下,WTL 和 6B 中稳定的最短路径数如图 2 所示。随着温度的升高,WTL 和 6B 中两个节点之间形成的稳定的最短路径数都减少了,说明在高温下,残基之间以及残基-水之间的作用会不断断裂和形成,路径难以保持稳定,也就是节点之间的信号传递波动较大。在 300 K 下,WTL 中的稳定的最短路径数为 493,6B 中的为 542。当温度升高到 400 K 时,WTL 中稳定的最短路径数急剧下降成 83,6B 中的下降为 147。显然,不管是在 300 K 还是

400 K 温度下,6B 中的稳定路径数都大于 WTL 中的,这可以说明 WTL 中节点之间的路径在高温下波动较大,信号传递受高温的影响大于 6B,并且 6B 中残基之间以及残基-水之间的作用力比 WTL 稳定,信号传递更频繁,残基之间以及残基-水之间的作用力有利于脂肪酶的热稳定性^[36]。

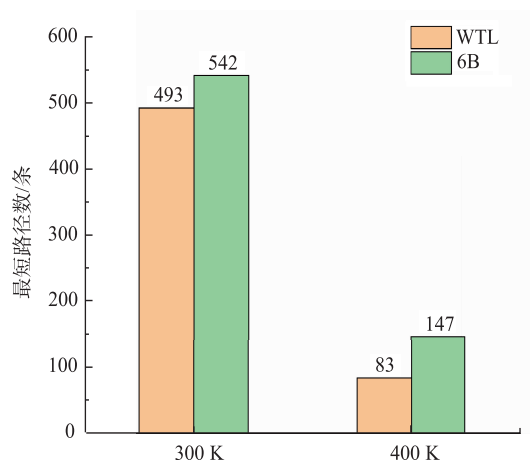


图 2 不同温度下 WTL 和 6B 中稳定的最短路径数

Fig. 2 Number of shortest stable paths in WTL and 6B at different temperatures

2.2 最短路径与脂肪酶耐热性的关系

为了更清楚了解残基和水之间的信号传递,获得脂肪酶残基-水全网络中所有节点之间的最短路径以及在所有时间帧的出现次数后,统计了 WTL 和 6B 在两种温度下(300 K 和 400 K)残基到水分子之间稳定的最短路径的长度,结果如图 3 所示。随温度升高,WTL 和 6B 中残基到水分子之间的最短路径长度明显减少,说明残基之间以及残基和水之间的作用力会随着温度升高越来越不稳定,有的甚至会消失,残基到水分子之间的信号传递强度在高温下也会降低。由图 3(a)可以看出:在 300 K 时,WTL 和 6B 中路径长度最长的为 8,即路径中包含 8 个节点,并且 $6 < \text{路径的长度} \leq 8$ 的路径数都在 10 个左右。所以接下来主要对 300 K 下路径长度排名前 10 的路径进行比较分析。在 400 K 时(图 3(b)),路径长度最长的只有 5,WTL 中只有 1 条路径长度为 5,6B 中有 8 条,明显大于 WTL,但为了比较分析,主要对 400 K 下路径长度排名前 5 的路径进行提取分析,具体的数据如表 1、表 2 和表 3 所示。

从表 1 和表 2 可知:300 K 时,WTL 中的路径长度最长为 8,6B 中最长的仅为 7,将 WTL 中与 6B

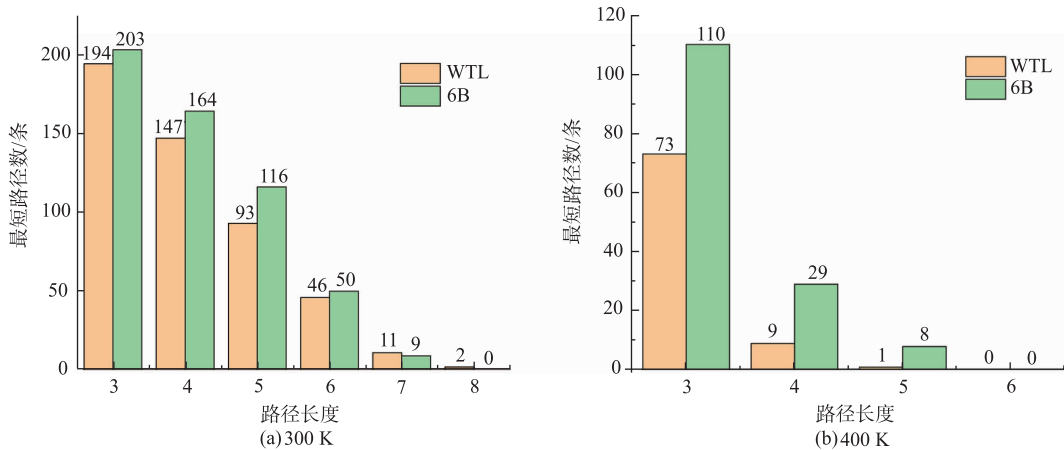


图 3 不同温度下 WTL 和 6B 中不同长度路径的稳定的最短路径数

Fig. 3 Number of shortest stable paths with different path length in WTL and 6B at different temperatures

表 1 300 K 温度下 WTL 残基到水分子之间路径长度排名前 10 的稳定路径

Table 1 Stable paths from residues in WTL to water molecules at 300 K in the top ten of path length

路径	出现次数	路径长度	命名
Met134-Asp133-His156-His76-Val9-Phe41-Trp42-water	291	8	SP1_WTL300
Ala132-Asp133-His156-His76-Val9-Phe41-Trp42-water	284	8	SP2_WTL300
Asn51-Phe41-Val9-His76-His156-Asp133-water	296	7	SP3_WTL300
Gly155-His156-His76-Val9-Phe41-Trp42-water	293	7	SP4_WTL300
Asp133-His156-His76-Val9-Phe41-Trp42-water	292	7	SP5_WTL300
Trp42-Phe41-Val9-His76-His156-Asp133-water	292	7	SP6_WTL300
Thr47-Asn48-Gly52-Ser56-Gln60-Asp64-water	287	7	SP7_WTL300
Asn98-Ile73-Val9-His76-His156-Asp133-water	287	7	SP8_WTL300
Val96-Ile73-Val9-His76-His156-Asp133-water	284	7	SP9_WTL300
Gly46-Asn51-Pro53-Arg57-Lys61-Glu65-water	280	7	SP10_WTL300

表 2 300 K 温度下 6B 残基到水分子之间路径长度排名前 10 的稳定路径

Table 2 Stable paths from residues in 6B to water molecule at 300 K in the top ten of path length

路径	出现次数	路径长度	命名
Gly46-Asn51-Leu55-Val59-Leu63-Lys69-water	290	7	SP1_6B300
Thr47-Asn51-Leu55-Val59-Leu63-Lys69-water	290	7	SP2_6B300
Tyr49-Asn51-Leu55-Val59-Leu63-Lys69-water	290	7	SP3_6B300
Gly46-Asn51-Pro53-Arg57-Lys61-Glu65-water	283	7	SP4_6B300
Met78-Gly79-Thr83-Ile87-Ile123-Lys122-water	275	7	SP5_6B300
Lys69-Leu63-Val59-Leu55-Asn51-Asn50-water	274	7	SP6_6B300
Gly46-Asn51-Gly52-Ser56-Gln60-Asp64-water	272	7	SP7_6B300
Pro53-Asn51-Lys61-Val9-Phe19-Glu20-water	272	7	SP8_6B300
Asn98-Ile73-Val9-Phe19-Glu20-water	295	6	SP9_6B300
Gly52-Asn51-Phe41-Asp40-water	300	5	SP10_6B300

表 3 400 K 温度下 WTL 和 6B 残基到水分子之间路径长度排名前 5 的稳定路径

Table 3 Stable paths from residues in WTL and 6B to water molecules at 400 K in the top five of path length

WTL		6B	
路径(出现次数)	命名	路径(出现次数)	命名
Gly79-Gly80-Leu84-Lys88-water (275)	SP1_WTL400	Val39-Met8-Phe19-Glu20-water (296)	SP1_6B400
Ala68-Leu63-Asp64-water (294)	SP2_WTL400	Val7-Met8-Phe19-Glu20-water (295)	SP2_6B400
Gln60-Lys61-Glu65-water (289)	SP3_WTL400	Tyr37-Met8-Phe19-Glu20-water (292)	SP3_6B400
Leu84-Tyr85-Asn89-water (280)	SP4_WTL400	Gln29-Tyr25-Gly21-Glu20-water (280)	SP4_6B400
Ile128-Tyr129-Gln150-water (280)	SP5_WTL400	Leu124-Tyr125-Ala113-Asp144-water (278)	SP5_6B400

中路径长度一样的路径相比,WTL 中的这些路径在所有时间帧的出现次数普遍都大于 6B 中的路径。说明 WTL 在 300 K 时残基到水分子之间的信号传递强度稍微强一点。当温度升高到 400 K 时(表 3),WTL 和 6B 中的路径长度最长都为 5,其中,WTL 中路径长度为 5 的路径只有 1 条,而 6B 中的 5 条路径的长度都为 5,并且 6B 中的路径长度为 5 的路径在所有时间帧中的出现次数都是大于 WTL 中路径长度为 5 的路径。这说明:高温下,与 WTL 相比,6B 中残基和水分子之间可以形成稳定的路径从而加强残基和水分子之间的信号传递,也体现了 6B 中残基与残基以及残基与水的作用力更紧密更稳定,这维持了脂肪酶的耐热性^[10]。从表 4 可以看出:WTL 和 6B 最短路径中的残基大部分都位于 loop 和 α B。由表 5 可知:WTL 最短路径中的残基大部分位于 α B 和 α C,而 6B 最短路径中的残基大部分位于 loop 和 α A。说明:loop 和 α 螺旋中的残基容易与残

基以及水分子形成稳定的相互作用,形成稳定的路径从而加强脂肪酶的结构。一般来说,脂肪酶的 loop 区域和 turn 区域非常灵活,其次是 α 螺旋。loop 和 α 螺旋的残基与残基以及残基与水之间的相互作用可以降低 loop 和 α 螺旋的灵活性,增强刚性,从而促进蛋白质的热稳定性^[37]。

表 1 中,SP1_WTL300 和 SP2_WTL300 中除了起始节点不一样,其他路径中经过的节点都是一样的,可以认为是相似路径,同一个酶中的相似路径,就可以认为是主干路径。表 1 中前 6 条路径以及 SP8_WTL300 和 SP9_WTL300 中都频繁经过 His156、His76 和 Val9,其中位于 β 5 的 His76 可以分别与 loop (β 8 与 α F 之间)的 His156 和 β 3 上的 Val9 形成稳定的氢键作用,从而可以加强柔性区域 loop 与 β 5、 β 3 之间的联系。从脂肪酶的二级结构,可以看出另外两条路径 SP7_WTL300 和 SP10_WTL300 可以使得 loop(α B 与 β 4 之间)与 α B

表 4 300 K 温度下 WTL 和 6B 残基到水分子之间稳定的最短路径中的残基在脂肪酶二级结构中的分布

Table 4 Distribution of residues in the shortest stable path from residues in WTL and 6B to water molecules at 300 K in the secondary structure of lipase

WTL		6B	
脂肪酶的二级结构	最短路径中的残基	脂肪酶的二级结构	最短路径中的残基
loop	Phe41,Trp42,Gly46,Thr47,Ala132,Asp133,Met134,Gly155,His156	loop	Asp40,Phe41,Gly46,Thr47,Lys69,Lys122,Ile123
β 6	Asn98	β 6	Asn98
β 5	Ile73,His76	β 5	Ile73
α B	Asn48,Asn51,Gly52,Pro53,Ser56,Arg57,Gln60,Lys61,Glu65	α B	Tyr49,Asn50,Asn51,Gly52,Pro53,Leu55,Ser56,Val59,Gln60,Lys61,Leu63,Asp64
3_{10} 螺旋	Val96	3_{10} 螺旋	Phe19
β 3	Val9	β 3	Val9
		α A	Glu20
		α C	Met78,Gly79,Thr83,Ile87

表 5 400 K 温度下 WTL 和 6B 残基到水分子之间稳定的最短路径中的残基在脂肪酶二级结构中的分布
Table 5 Distribution of residues in the shortest stable path from residues in WTL and 6B to water molecule at 400 K in the secondary structure of lipase

WTL		6B	
脂肪酶的二级结构	最短路径中的残基	脂肪酶的二级结构	最短路径中的残基
$\beta 7$	Ile128,Tyr129	$\beta 7$	Leu124,Tyr125
loop	Ala68	loop	Val39,Ala113,Asp144
$\beta 8$	Gln150	$\beta 4$	Tyr37
αC	Gly79,Gly80,Leu84,Lys88,Asn89	αA	Glu20,Gly21,Tyr25,Gln29
αB	Gln60,Lys61,Leu63,Asp64	3_{10} 螺旋	Phe19
		$\beta 3$	Val7,Met8

之间的关系更紧密。表 2 中,6B 前 3 条路径都为主干路径,并且 SP6_6B300 和这 3 条路径一样,都频繁经过 αB 上的 Leu63、Val59、Leu55、Asn51 和 Lys69 这 5 个节点,这 5 个节点之间都能够形成稳定的氢键作用,并且 Asn51 分别与 loop (αB 与 $\beta 4$ 之间)的 Gly46 和 αB 上的 Tyr49 形成范德华力,与 Thr47 形成氢键作用,从而加强了 loop 与 αB 之间的联系。SP4_6B300、SP7_6B300 和 SP10_6B300 虽然经过的节点不太一样,但也是加强了 loop (αB 与 $\beta 4$ 之间)与 αB 之间的联系。另外,SP5_6B300 是连接 6B 中 loop ($\beta 6$ 与 $\beta 7$ 之间)、 αC 与水分子的重要路径,SP9_6B300 则是加强了 6B 中的 $\beta 6$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 3$ 、 αB 以及 3_{10} 螺旋之间的联系。以上可以表明 300 K 温度下,WTL 和 6B 中经过的二级结构差异不是很大,但是随着温度的升高,WTL 和 6B 中差异更明显。结合表 3 和表 5,SP1_WTL400 和 SP4_WTL400 仅仅是加强了 αC 内部与水之间的信号传递,SP3_WTL400 也只是使得 αB 内部的结构更紧密。WTL 中另外两条路径 SP2_WTL400 和 SP5_WTL400 分别加强了 loop (αB 与 $\beta 5$ 之间)和 αB 间的关系以及 $\beta 7$ 和 $\beta 8$ 间的联系。SP1_6B400、SP2_6B400 和 SP3_6B400 是主干路径,它们共同经过的节点为 $\beta 3$ 上的 Met8、 3_{10} 螺旋上的 Phe19 以及 αA 的 Glu20,这 3 条路径的起始节点分别为位于 loop (αB 与 $\beta 4$ 之间)的 Val39、 $\beta 3$ 上的 Val7、 $\beta 4$ 上的 Tyr37,所以这 3 条路径使得这些区域连接更加紧密,也加强了这些区域与水之间的信号传递。另外两条路径中,SP4_6B400 使得 αA 内部的结构更紧密,SP5_6B400 则是连接 loop 和 $\beta 7$ 的重要路径,其中 Ala113 位于脂肪酶最长的 loop 区域 ($\beta 6$ 与 $\beta 7$

之间),它可以与另一条 loop ($\beta 7$ 与 $\beta 8$ 之间)上的 Asp144 形成稳定的氢键作用,可以稳定两个 loop 区域,从而稳定 6B 的二级结构。总之,这些区域的最短路径都可以降低柔性区域的柔性,从而可以抵抗高温。

通常 3_{10} 螺旋是不稳定的,而且有研究表明: 3_{10} 螺旋的剧烈运动会影响结构的稳定性^[27]。从表 4 可以看出 WTL 中的 Val96 和 6B 中的 Phe19 位于 3_{10} 螺旋。WTL 中包含 Val96 的路径只有 SP9_WTL300,其中 Val96 和 $\beta 5$ 上的 Ile73 之间可以形成稳定的范德华力。与 WTL 相比,6B 在 300 K 温度下包含 Phe19 的路径有 2 条,400 K 温度下有 3 条,这几条路径中 Phe19 与 Val9、Met8 和 Glu20 之间都有形成强大的范德华力,从而稳定 3_{10} 螺旋,稳定脂肪酶结构。这可以说明 6B 中通过的 3_{10} 螺旋的信号传递比 WTL 更强更稳定。另外,值得注意的是:6B 中与 Phe19 形成范德华力的 Glu20 位于 αA 的 N 端,由 Ala20 突变而成,可以表明:突变之后的 Glu20 更容易与水形成氢键作用,并且与水形成氢键的能力比较稳定,A20E 突变使脂肪酶热稳定性增强。综合分析:与 WTL 相比,不管是 300 K 还是 400 K,6B 中的路径经过了更多的二级结构,使得 6B 中的结构更加紧密,加强了残基与水分子之间的信号传递,稳定了脂肪酶的二级结构。

3 结语

本研究结合分子动力学模拟得到 WTL 和 6B 的运动轨迹构象,构建脂肪酶动态残基-残基和残基-水相互作用网络(简称残基-水全网络),通过分析两种脂肪酶在不同温度下的最短路径来探讨脂

脂肪酶突变与热稳定性之间的关系,进一步分析研究残基和水之间的信号传递的动态变化。通过 Dijkstra 算法对 WTL 和 6B 动态残基-水全网络进行最短路径计算,发现:6B 在不同温度下的稳定路径数都是大于 WTL 的,说明 WTL 中的节点之间的路径在高温下波动较大,信号传递受高温的影响大于 6B,并且 6B 中的残基之间以及残基-水之间的作用力比 WTL 稳定,信号传递更频繁。接着通过对稳定路径中残基所在的二级结构分析,发现残基到水分子之

间的最短路径可以减少脂肪酶的柔性区域 loop 和 α 螺旋的柔性,使得脂肪酶结构更稳定。与 WTL 相比,不管是 300 K 还是 400 K,6B 中的路径经过了更多的二级结构,使得 6B 中的结构更加紧密,加强了残基与水分子之间的信号传递,从而可以稳定脂肪酶的二级结构。另外,分析结果还发现突变体中的突变点 A20E 在突变之后更容易与水形成稳定的氢键作用,突变使脂肪酶热稳定性增强。

参考文献:

- [1] GUPTA R, GUPTA N, RATHI P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2004, 64(6): 763-781.
- [2] HASAN F, SHAH AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006, 39(2): 235-251.
- [3] CHAPLIN M. Opinion-do we underestimate the importance of water in cell biology[J]. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2006, 7(11): 861-866.
- [4] BALL P. Water as an active constituent in cell biology[J]. **Chemical Reviews**, 2008, 108(1): 74-108.
- [5] VAJDA T, PERCZEL A. Role of water in protein folding, oligomerization, amyloidosis and miniprotein[J]. **Journal of Peptide Science**, 2014, 20(10): 747-759.
- [6] BELLISSENT-FUNEL M C, HASSANALI A, HAVENITH M, et al. Water determines the structure and dynamics of proteins[J]. **Chemical Reviews**, 2016, 116(13): 7673-7697.
- [7] HELMS V. Protein dynamics tightly connected to the dynamics of surrounding and internal water molecules [J]. **ChemPhysChem**, 2007, 8(1): 23-33.
- [8] PIZZITUTTI F, MARCHI M, STERPONE F, et al. How protein surfaces induce anomalous dynamics of hydration water[J]. **The Journal of Physical Chemistry B**, 2007, 111(26): 7584-7590.
- [9] ROGOV V V, SCHMOE K, LOHR F, et al. Modulation of the Rcs-mediated signal transfer by conformational flexibility[J]. **Biochemical Society Transactions**, 2008, 36(6): 1427-1432.
- [10] HONG S, KIM D. Interaction between bound water molecules and local protein structures: a statistical analysis of the hydrogen bond structures around bound water molecules[J]. **Proteins**, 2016, 84(1): 43-51.
- [11] STERPONE F, BERTONATI C, BRIGANTI G, et al. Water around thermophilic proteins: the role of charged and apolar atoms [J]. **Journal of Physics: Condensed Matter**, 2010, 22(28): 284113.
- [12] CHAKRABORTY D, TALY A, STERPONE F. Stay wet, stay stable? How internal water helps the stability of thermophilic proteins[J]. **The Journal of Physical Chemistry B**, 2015, 119(40): 12760-12770.
- [13] SCHIRO G, FICHOY Y, GALLAT F X, et al. Translational diffusion of hydration water correlates with functional motions in folded and intrinsically disordered proteins[J]. **Nature Communications**, 2015, 6(1): 6490.
- [14] NANDI P K, ENGLISH N J, FUTERA Z, et al. Hydrogen-bond dynamics at the bio-water interface in hydrated proteins: a molecular-dynamics study[J]. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 2017, 19(1): 318-329.
- [15] MILENKOVIC S, BONDAR A N. Mechanism of conformational coupling in SecA: key role of hydrogen-bonding networks and water interactions[J]. **BBA-Biomembranes**, 2016, 1858(2): 374-385.
- [16] KUFFEL A. How water mediates the long-range interactions between remote protein molecules[J]. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 2017, 19(7): 5441-5448.
- [17] GUERRA F, SIEMERS M, MIELACK C, et al. Dynamics of long-distance hydrogen-bond networks in photosystem II[J]. **The Journal of Physical Chemistry B**, 2018, 122(17): 4625-4641.
- [18] CHONG S H, HAM S. Dynamics of hydration water plays a key role in determining the binding thermodynamics of protein

- complexes[J]. **Scientific Reports**, 2017, 7(1):8744.
- [19] 汪小帆, 李翔, 陈关荣. 复杂网络理论及其应用[M]. 北京: 清华大学出版社, 2006.
- [20] ZHANG J, SUO Y, ZHANG Y H, et al. Mining for genes related to choroidal neovascularization based on the shortest path algorithm and protein interaction information[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2016, 1860(11):2740-2749.
- [21] PAPALEO E, LINDORFF-LARSEN K, DE GIOIA L. Paths of long-range communication in the E2 enzymes of family 3: a molecular dynamics investigation[J]. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 2012, 14(36):12515-12525.
- [22] 李敏, 陈建二, 王建新. 基于最短路径的蛋白质相互作用网络拓扑分析[J]. 高技术通讯, 2009, 19(1):89-94.
- [23] DIJKSTRA E W. A note on two problems in connexion with graphs[J]. **Numerische Mathematik**, 1959, 1(1):269-271.
- [24] FLOYD R W. Algorithm 97: shortest path[J]. **Communications of the ACM**, 1962, 5(6):345.
- [25] BELLMAN R. On a routing problem[J]. **Quarterly of Applied Mathematics**, 1958, 16(1):87-90.
- [26] AHMAD S, KAMAL M Z, SANKARANARAYANAN R, et al. Thermostable *Bacillus subtilis* lipases: *in vitro* evolution and structural insight[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2008, 381(2):324-340.
- [27] KAMAL M Z, AHMAD S, MOLUGU T R, et al. *In vitro* evolved non-aggregating and thermostable lipase: structural and thermodynamic investigation[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2011, 413(3):726-741.
- [28] CASE D A, RD C T, DARDEN T, et al. The AMBER biomolecular simulation programs[J]. **Journal of Computational Chemistry**, 2010, 26(16):1668-1688.
- [29] ESSMANN U, PERERA L, BERKOWITZ M L, et al. A smooth particle mesh Ewald method[J]. **Journal of Chemical Physics**, 1995, 103(19):8577-8593.
- [30] COLEMAN T G, MESICK H C, DARBY R L. Numerical integration: a method for improving solution stability in models of the circulation[J]. **Annals of Biomedical Engineering**, 1977, 5(4):322-328.
- [31] PIOVESAN D, MINERVINI G, TOSATTO S C E. The RING 2.0 web server for high quality residue interaction networks[J]. **Nucleic Acids Research**, 2016, 44(W1):367-374.
- [32] HUMPHREY W, DALKE A, SCHULTEN K. VMD: Visual molecular dynamics[J]. **Journal of Molecular Graphics**, 1996, 14(1):33-38.
- [33] GUZEL P, KURKCUOGLU O. Identification of potential allosteric communication pathways between functional sites of the bacterial ribosome by graph and elastic network models[J]. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, 2017, 1861(12):3131-3141.
- [34] CHENNUBHOTLA C, BAHAR I. Signal propagation in proteins and relation to equilibrium fluctuations[J]. **PLoS Computational Biology**, 2007, 3(9):1716-1726.
- [35] MARDANAH, MAHARANI S, HATTA H R. Applications to determine the shortest tower BTS distance using Dijkstra algorithm [R]. AIP Conference Proceedings, 2017, 1813:40002.
- [36] STERPONE F, BERTONATI C, BRIGANTI G, et al. Key role of proximal water in regulating thermostable proteins[J]. **The Journal of Physical Chemistry B**, 2008, 113(1):131-137.
- [37] PRAKASH CHANDRA R, KARL-ERICH J, HOLGER G J P O. Structural rigidity and protein thermostability in variants of Lipase A from *Bacillus subtilis*[J]. **PLOS One**, 2015, 10(7):e0130289.