

Биол. журн. Армении, 3-4 (57), 2005

УДК 577.32

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФОСФОГЛИЦЕРАТ МУТАЗЫ И ЕНОЛАЗЫ И ВЫЯВЛЕНИЕ ЭФФЕКТА ТУННЕЛИРОВАНИЯ ПРИ ПОМОЩИ КОМПЬЮТЕРНОЙ СИМУЛЯЦИИ

Д.Э. АКОПЯН

Институт молекулярной биологии НАН Армении, 375014, Ереван

С использованием метода молекулярной динамической симуляции получена картина взаимодействия фосфоглицерат мутаза и енолазы, взятых из дрожжей. Рассмотрены две ориентации, где активные центры ферментов расположены преимущественно друг против друга для выявления возможного эффекта туннелирования. Показано, что ферменты склонны взаимодействовать именно своими околоактивными центрами. Полученное взаимодействие между околокаталитическими центрами является необходимым условием для наличия метаболического туннеля посредством прямой передачи промежуточного продукта.

Օգտագործելով մոլեկուլային դինամիկ սիմուլյացիոն մեթոդը, հաջողվեց ստանալ խմորասնկից վերցված ֆոսֆոգլիցերատ մուտազի և էնոլազի միջև փոխազդեցության պատկեր: Դիտարկվել է մուտազի և էնոլազի երկու տարբեր դիրքորոշումներ, որտեղ ֆերմենտների ակտիվ կենտրոնները ուղղված են եղել հնարավորին չափով միմյանց դեմ, որպեսզի գրանցել հնարավոր թունելային անցման երևույթը: Ցույց է տրվել, որ ֆերմենտները հակված են փոխազդելու, հենց իրենց ակտիվ կենտրոններին կից հատվածներով: Գրանցված ակտիվ կենտրոնների փոխազդեցությունը անհրաժեշտ պայման է մետաբոլիկ թունելի ստեղծման համար:

Molecular dynamics simulation has been used to investigate interaction between phosphoglycerate mutase and enolase taken from yeast. Two orientations have been observed where active sites of enzymes have been oriented toward each other for detection of possible channelling. It has been shown that enzymes are inclined to interact with each other with their catalytic regions. This interaction is a necessary condition for channelling to occur by means of direct transfer mechanism.

Фосфоглицерат мутаза - енолаза - эффект туннелирования

Гликолиз это процесс преобразования глюкозы в пируват с дальнейшим превращением в лактат или этанол или с вовлечением его в процесс окислительного фосфорилирования. Гликолиз играет ключевую роль как в клетках эукариот, так и прокариот. Основную роль в процессе преобразования играют девять ферментов. Наиболее распространенная модель процесса преобразования считается модель цепочечного взаимодействия [12]. В рамках этой модели каждый из девяти ферментов катализирует преобразование субстрата (первичного или промежуточного), который затем путем диффузии переходит к следующему ферменту. Уменьшение интенсивности или блокировка процесса преобразования, вызванная, например, бактерией

Trypanosoma brucei у человека, является причиной сонной болезни [5].

Появление эффекта туннелирования может способствовать повышению эффективности метаболического потока, снижению времени перехода метаболита от активного центра текущего фермента к активному центру следующего и предотвращению диффузии метаболита [10]. Формирование метаболического туннеля (м.т.) может быть результатом как статического, так и динамического взаимодействия. Особенно интересны процессы динамического взаимодействия, где могут проявляться регуляторные особенности процессов взаимодействия.

Часто ферменты, взаимодействуя друг с другом, образуют динамические комплексы, что частично объясняется слабыми силами взаимодействия между ними [12]. М.т. может существовать как система организации микрокомпартамента (microcompartment organization) или может реализоваться при помощи прямой передачи (direct transfer) метаболита между активными центрами взаимодействующих ферментов. Прямая передача является крайним случаем метаболитного компартамента, когда концентрация буферизованного метаболита внутри фермента равна нулю и имеет место его перенос без взаимодействия со средой из активного центра первого фермента к активному центру второго [10]. В ряде случаев было показано существование м.т. в виде механизмов прямой передачи и компартментной организации между динамически связанными гликолитическими ферментами, таких как альдолаза и глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа и глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа и фосфоглицераткиназа [10].

Известны исследования, в которых было изучено взаимодействие гликолитических ферментов, альдолазы и глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназы для выявления м.т. методом молекулярной динамической симуляции [9]. При помощи этого метода компьютер используется как виртуальная лаборатория, где можно, в частности, исследовать взаимодействие белков на уровне каждого атома [11]. Метод симуляции молекулярной динамики, будучи сравнительно новым для изучения биологических процессов, является одним из самых перспективных методов анализа поведения белковых взаимодействий.

Целью данной работы было изучение взаимодействия фосфоглицерат мутаза и енолазы с использованием нового метода молекулярной динамики.

Материал и методика. Исследовалось взаимодействие фосфоглицерат мутаза и енолазы, выделенных из дрожжей. Компьютерная симуляция была проведена с помощью кристаллических структур этих ферментов, полученных рентгеноструктурным анализом. Подобные белковые структуры можно найти в общедоступной интернет базе RCSB Protein Data Bank [3]. Коды мутаза (КФ 5.4.2.1) и енолазы (КФ 4.2.1.11) в базе обозначены соответственно 1QHF [6] и 2ONE [14]. Для молекулярной динамической симуляции использовали программу CHARMM [4].

Имеющиеся в фермент-субстратном комплексе мутаза-3-фосфоглицерат, две молекулы субстрата при помощи программы Hyperchem [8] были преобразованы в 2-фосфоглицерат для исследования пост-каталитического взаимодействия мутаза с енолазой, а также возможной прямой передачи метаболита между мутазой и енолазой.

Известно, что у дрожжей оба фермента являются димерами. 2-фосфоглицерат и фосфоенолпируват были удалены из начальной структуры енолазы для освобождения активных центров последней. При помощи компьютерной симуляции были исследованы две ориентации ферментов. В обоих случаях активные центры были ориентированы друг против друга для более вероятного обнаружения взаимодействия и возможного создания метаболического туннеля.

Двум остаткам 2-фосфоглицерата был дан заряд $-3e$ в единицах заряда электрона. Эти три отрицательных заряда для каждого субстрата были распределены между одним из атомов кислорода, связанным с первым атомом углерода, и между двумя атомами кислорода, связанными с атомом фосфора (неорганический фосфат). Мутаза имела заряд $+6e$, с зарядом $+3e$ на каждую субъединицу. Один из этих трех положительных зарядов приходился на активный центр Гис8 (протонированного атома азота). Остальной заряд $+2e$ получился как результат суммирования положительных и отрицательных зарядов R-групп аминокислотных остатков, входящих в состав субъединицы мутазы. Енолаза получила заряд $-8e$ ($-4e$ на каждую субъединицу димера), что было результатом четырех некомпенсированных аминокислот с отрицательными R-группами в составе субъединицы енолазы. Ферменты были помещены в водяную коробку (куб), размерами $173 \times 173 \times 173 \text{ \AA}$ на расстоянии $10 \text{ \AA}$ друг от друга. Были добавлены ионы Na^+ и Cl^- в концентрации 150 mM и ионы Mg^{2+} в концентрации 3 mM , причем два из последних были расположены непосредственно около активных центров енолазы. Общий заряд был равен нулю. Общее число атомов в каждой из двух систем составляло около 150000 .

Результаты и обсуждение. Ранее была показана специфичность взаимодействия мутазы и енолазы у дрожжей [1, 7]. Симуляция, представленная в настоящей работе, была сделана на специальном кластере (ArmCluster), который был любезно предоставлен Институтом информатики и проблем автоматизации НАН Армении. Общее время симуляции заняло примерно 23800 ч процессорного времени с использованием 32 процессоров с частотой 3 ГГц . За это время было смоделировано 0.5 наносекунд (н.с.) биологического времени для двух ориентаций мутазы и енолазы.

Как и у многих ферментов, в активный центр енолазы входит гистидин (Гис), занимающий 159 -ю позицию в аминокислотной последовательности. Для каждой субъединицы димера у мутазы гистидин активного центра занимает 181 -ю позицию. Два 2-фосфоглицерата с начала симуляции были расположены около активных центров мутазы. Эти два метаболита связываются водородными связями с аминокислотными остатками мутазы [6]. То что мутаза и енолаза так или иначе взаимодействуют друг с другом очевидно хотя бы из того, что среднее расстояние между гликолитическими ферментами в цитоплазме намного меньше размеров самих ферментов [2]. Далее из того факта, что число метаболитов в цитоплазме намного ниже числа самих ферментов, следует, что каталитическая эффективность ферментов намного ниже своего возможного максимального значения [10]. В связи с этим было показано, что из-за превосходящей концентрации ферментов, кроме своих биологических функций, гликолитические ферменты могут нести также и физиологическую функцию, возможно, они выполняют и буферную роль для метаболитов, чья свободная (не связанная с ферментами) концентрация в цитоплазме незначительна по сравнению с концентрацией связанных метаболитов [13]. Отсюда можно предположить, что вероятность

сцепления метаболитов с гликолитическими ферментами в процессе свободной диффузии мала, так как уже имеет место преобладающая компартментная организация (забуференный метаболит).

Как было сказано выше, для детекции метаболического туннеля, проявляющегося через прямую передачу метаболита между активными центрами ферментов, были изучены две ориентации мутазы и енолазы.

Для первой ориентации активный центр второй субъединицы мутазы (где находится второй 2-фосфоглицерат) расположен напротив активного центра второй субъединицы енолазы, а для второй ориентации активный центр второй субъединицы мутазы находился напротив активного центра первой субъединицы енолазы.

На рис. 1а и 1б показаны начальные конфигурации обеих ориентаций.

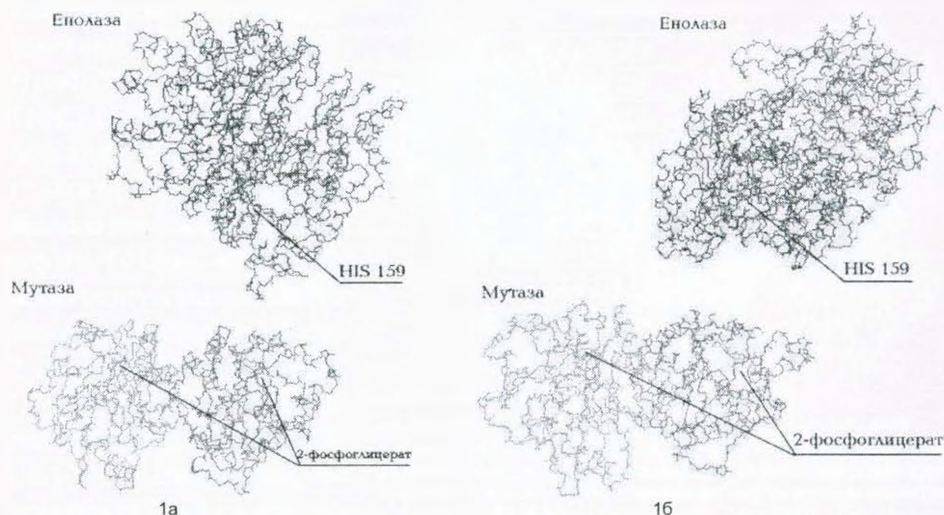


Рис. 1а, б. Начальные конфигурации мутазы и енолазы для обеих ориентаций. Активный центр одной из субъединиц енолазы для каждой ориентации расположен непосредственно над одним из активных центров мутазы, где находится 2-фосфоглицерат субстрат.

Для наглядности показана только основная полипептидная цепь ферментов, где удалены R-группы аминокислот, а также молекулы воды и ионы.

На рис. 2а и 2б показаны те же системы после 0.5 н.с. симуляции. Из рис. видно, что активные центры енолазы и мутазы склонны взаимодействовать. Последнее является необходимым условием для появления м.т.

В таблицах приведена энергия взаимодействия (как сумма электростатической и Ван дер Вальсовой энергии) наиболее активно взаимодействующих аминокислот енолазы и мутазы соответственно, после 0.5 н.с. симуляции для второй из ориентаций, которая наиболее наглядно отображает картину взаимодействия.

Все расчеты по выявлению взаимодействующих аминокислотных

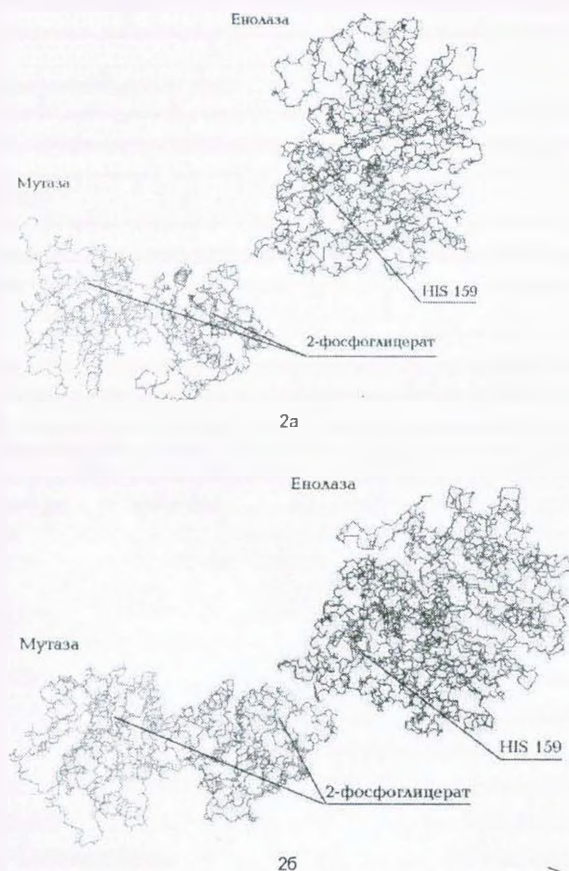


Рис. 2а, б. Ориентация мутазы и енолазы для тех же конфигураций после 0.5 наносекундной симуляции. Очевидно, что есть взаимодействие околоактивного центра, именно енолазы с активным центром мутазы, где находится 2-фосфоглицерат субстрат.

остатков ферментов были проведены той же программой CHARMM. Для каждой аминокислоты мутазы и енолазы была вычислена энергия взаимодействия с взаимодействующим ферментом, а также расстояние данного остатка от того же фермента. При сравнении этих данных для мутазы и енолазы стала возможной следующая детализация по аминокислотным остаткам. Взаимодействующие участки являются Арг7-Фен19, Лей27-Арг37, Лиз95-Сер115 и Ала198-Иле209 для фосфоглицерат мутазы и Сер249-Сер270 для енолазы. Арг114 и Лиз202 второй субъединицы мутазы самые сильно взаимодействующие с енолазой (Асп255, табл. 1.) аминокислоты (табл. 2.), находящиеся соответственно на расстоянии 1.7 и 1.8 Å от остатка Асп255 енолазы.

Таблица 1. Энергия взаимодействия аминокислотных остатков енолазы с фосфоглицерат мутазой

Аминокислотный остаток первой субъединицы (А) енолазы	Полная энергия взаимодействия, ккал/моль
Асп 255	-106.79346
Лиз 254	-14.25917
Лиз 257	-5.88858
Лиз 53	2.90772
Асн 264	-2.38028
Фен 253	2.19422
Глу 251	1.66430
Асп 259	1.50227
Лиз 269	1.45469

Энергия отталкивания между остатками Лиз30 мутазы (табл. 2.) и Лиз269 (положительный знак энергии взаимодействия свидетельствует о превосходящей электростатической энергии между двумя положительно заряженными аминокислотами Лиз по сравнению с их ван дер Вальсовской энергией взаимодействия) почти полностью компенсируется энергией притягивания между Глу34 мутазы (табл. 2.) и тем же остатком Лиз269 енолазы (табл. 1). Кроме того, аминокислоты Глу106 мутазы и Лиз254 енолазы также показывают сильную положительную связь (табл. 1 и 2).

Таблица 2. Энергия взаимодействия аминокислотных остатков мутазы с енолазой

Аминокислотный остаток второй субъединицы (Б) мутазы	Полная энергия взаимодействия, ккал/моль
Лиз 202	-57.16209
Арг 114	-44.27127
Лиз 30	18.25827
Глу 34	-12.05011
Глу 106	-10.68117
Асн 14	-3.66183
Глн 10	3.14232
Лиз 103	2.95263
Глу 15	-2.51458
Лиз 102	1.75434
Лиз 97	-1.59517
Арг 113	-1.38120
Асн 110	1.06484

Для второй ориентации (рис. 2б) аминокислота Лиз269 енолазы наиболее сильно взаимодействует с 2-фосфоглицератом с энергией взаимодействия, равной -0.84136 ккал/моль на расстоянии $6.8 \text{ \AA}$.

Таким образом, для двух различных ориентаций фосфоглицерат мутазы и енолазы было показано, что они склонны взаимодействовать между своими околоактивными участками. Это является необходимым фактором для туннелированного перехода посредством прямого переноса метаболита между активными центрами ферментов.

В настоящее время эксперименты по симуляции для получения более объемлющей картины взаимодействия продолжаются.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акопян Д.Э., Назарян К.Б. Докл. НАН Армении, 105, 3, 283-288, 2005.
2. Batke J. J. Theor. Biol., 152, 41-46, 1991.
3. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z. et al. "The Protein Data Bank." Nucleic Acids Research, 28, 235-242. Website: <http://www.rcsb.org/pdb/>, 2000.

4. Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., et al. J.Comp.Chem., 4, 187-217, 1983.
5. Chevalier N., Ridgen D.J., Joris Van Roy et al. Euro.J.Biochem., 267, 1464-1472, 2000.
6. Crowhurst G.S., Dalby A.R., Isupov M.N., et al. J.Biol.Cryst., 55, 1822-1826, 1999.
7. Hakobyan D., Nazaryan K. J.FEBS, 272, Supplement 1, 2005.
8. HyperChem™ Professional 7.51, Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA.
9. Ouporov I.V., Knull H.R., Huber A. et al. J.Biophys., 80, 2527-2535, 2001.
10. Ovadi J. J.Theor.Biol., 152, 1-22, 1991.
11. Rapaport D.C. The Art of Molecular Dynamics Simulation, Cambridge Univ. Press, 1995.
12. Salerno C., Ovadi J., Churchich J. et al. Mechanism of Action and Regulation of Enzymes, Budapest, 147-160, 1975.
13. Srivastava D.K. J.Theor.Biol. 152, 93-100, 1991.
14. Zhang E., Brewer J.M., Minor W., et al. Biochemistry, 36, 12526-12534, 1997.

Поступила 11.VII.2005