ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ	<b>ԳԻՏՈՒԹՅՈ</b>	ՒՆՆԵՐԻ	ԱԶԳԱՅԻՆ	ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛИ	ЬНАЯ АК	АДЕМИЯ	НАУК	АРМЕНИИ
NATIONAL	ACADEMY	OF SCI	ENCES OF	ARMENIA
<u>ДОКЛАДЫ</u>	<u>12</u>	<u>54NF38VE</u>	ſ	REPORTS
<sup>Zuunnp</sup> Tom Volume 105		2005		<u>№</u> 3

## ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

በኮSጉ 577

### Դ. Է. Հակոբյան, Կ. Բ. Նազարյան

# Էնոլազի և Ֆոսֆոգլիցերատ մուտազի փոխազդեցության համակարգչային մոդելավորում

(Ներկայացված է ակադեմիկոս Կ. Գ. Ղարագյոզյանի կողմից 18/I 2005)

Գլիկոլիտիկ ֆերմենտները պատասխանատու են գլյուկոզան պիրուվատի և հակառակը փոխակերպման պրոցեսի համար։ Կան բազմաթիվ հակասական տվյալներ գլիկոլիտիկ ֆերմենտների կոմպլեքսագոյացման և վերջիններիս ֆիզիոլոգիական հետևությունների վերաբերյալ [1]։ Համակարգչային մոդելավորման` մոլեկուլային դինամիկայի սիմուլյացիոն մեթոդը նոր և խոստումնալից մոտեցում է այս տիպի պրոբլեմներ դիտարկելու համար։ Ֆոսֆոգլիցերատ մուտազը (ՖԳՄ) [EC 5.4.2.1] և էնոլազը [EC 4.2.1.11] գլիկոլիտիկ շղթայում իրար հաջորդող ֆերմենտներ են։ Խմորասնկի ՖԳՄ-ը պատասխանատու է ֆոսֆատային խումբը 3-ֆոսֆոգլիցերատի (3ՖԳ) երրորդ ածխածնի ատոմից 2-ֆոսֆոգլիցերատի (25Գ) երկրորդ ածխածնի ատոմին փոխմիարժեք տեղափոխելու մեջ։ S. cerevisiae խմորասնկի էնոլազը հոմոդիմեր է, որը կատալիզում է 2-d-ֆոսֆոգլիցերատի անցումը ֆոսֆոէնոլպիրուվատի [2]։ Նմանապես, Trypanosoma brucei (TB) օրգանիզմի էնոլազը կատալիզում է փոխմիարժեք անցումը 2-d-ֆոսֆոգլիցերատից ֆոսֆոէնոլպիրուվատի [3, 4]։ Հրատարակվել են հոդվածներ՝ կապված էնոլազ-մուտազ in vitro կոմպլեքսագոյացման գրանցման հետ [5, 6]։ Մի շարք մեթոդներ են կիրառվել` ստուգելու փոխազդեցությունը, նրա սպեցիֆիկությունը և որակական պարամետրերը։ Թույլ և դինամիկ փոխազդեցության բնույթ ունենալու պատձառով, արդյունքները հաձախ իրար չեն համապատասխանում։ Կոմպլեքսագոյացման երևույթը հայտնաբերելու մեթոդները առ այսօր ենթարկվում է տարբեր քննադատությունների։ Օրինակ` մեթոդը, հիմնված ֆլուորեսցենտային անիզոտրոպիայի վրա, պահանջում է, որպեսզի ֆերմենտի մոլեկուլները կովալենտ կապված լինեն ֆլուորեսցենտային ներկանյութերի հետ, որոնք կարող են փոխել ֆերմենտների փոխազդեցության պահվածքը [6]։

Տոսֆոզյիզերատ մուտազի և էնոյազի փոխազդեզությունը հետազոտելու համար, վերցվել են էնոյացի երկու կառուցվածքներ, տարբեր օրգանիզմներից, մոյեկույային դինամիկայի սիմույյացիայի համար։ Ուսումնասիրվել է TB մոնոմեր և S. cerevisiae (Sc.) խմորասնկի դիմեր էնոլազների փոխազդեցությունը Sc. ՖԳՄ-ի հետ՝ օգտագործելով ջրային արկղի մոդելը։ Օգտագործվել են սպիտակուցների ռենտգեն-անայիզի միջոցով ստացված հետևյալ եռաչափ մոդելները՝ վերցված RCSB Protein Data Bank-hg. TB էնոյազ մոնոմեր (PDB կnn` 10EP), Sc. \$4U (1QHF) և էնոլազ (20NE) դիմերներ։ Ֆերմենտները տեղադրվել են ջրային արկղի մեջ՝ միմյանցից անջատված 10 A<sup>o</sup> ջրային շերտով։ Ջրային արկղր մեծացվել է լրացուցիչ 30 A<sup>o</sup> չափով յուրաքանչյուր X, Y և Z ուղղություններով։ 25Գ-ները և ֆոսֆոէնոյաիրուվատը նախօրոք հեռազվել են խմորասնկի էնոյացից։ Նախքան էներգիայի մինիմիցացիային և մոլեկույային դինամիկային անցնելը խմորասնկի ՖԳՄ-ի երկու 3ՖԳները ձևափոխվել են 25Գ-ների՝ օգտագործելով Hyperchem 7.5 ծրագիրը։ Ամբողջ սիմուլյացիոն պրոցեսի ընթացքում ՖԳՄ-ի դիրքը ընտրված է եղել այնպես, որ նրա 2ՖԳ-ները «նայեն» էնոյազին՝ «մետաբոյիկ անցման» հավանականությունը մեծացնելու համար։ Համակարգի լիզքը վերաբաշխվել է հետևալ կերպ. SAU (+6e), 2SA (-3e), TB էնոլազ (-4e), Sc. էնոյազ (-8e)։ Ողջ սիմույյացիոն պրոցեսի և անայիզի համար օգտագործվել է CHARMM [8] համակարգչային ծրագիրը։ Դիտարկվել է երեսունչորս դիրք յուրաքանչյուր էնոյազի համար (30 աստիճան քայլով՝ X, Y, Z առանցքների նկատմամբ)։ Փոխազդող երկու սիստեմներն էլ պարունակել են ջրի բացահայտ ատոմներ (օգտագործվել է TIP3 ջրի մոլեկույային մոդելը. համակարգը պարունակել է մոտավորապես 25'000 ջրի մոյեկույ էնոյացի յուրաքանչյուր դիրքի համար)։ Ջրային արկղի մոտավոր չափերն են` 151 × 116 × 102 Å։

Կիրառվել է «Leapfrog» մոլեկուլային դինամիկայի մեթոդը՝ կոմպլեքսագոյացումը գրանցելու համար։ Նախապես համակարգի վրա կատարվել է էներգիայի մինիմիզացիա՝ պոտենցիալ էներգիան -2.8\*10<sup>5</sup> կԿալ/մոլ շեմին բերելու համար։ Մինիմիզացիան և դինամիկան կատարվել են հատուկ համակարգչային կոմպլեքսի վրա (ArmCluster): Ամբողջ սիմուլյացիոն պրոցեսը տևել է մոտավորապես 28224 համակարգչային ժամ։

TB էնոլազի և Sc. ՖԳՄ-ի փոխազդեցության արդյունքները համեմատվել են նույն ՖԳՄ-ի և Sc. էնոլազ դիմերի կոմպլեքսագոյացման արդյունքների հետ։ Գրանցվել են TB էնոլազի փոխազդող ամինաթթվային մնացորդները։ Փոխազդեցության պատկերը ակնաոու դարձնելու համար ներմուծվել է փոխազդեցության ինտենսիվության պարամետրը, որր ցույց է տալիս թե քանի անգամ է տվյալ ամինաթթվային մնացորդը գտնվել ՖԳՄ-ից կամ 2ՖԳ-ից ավելի փոքր հեռավորության վրա քան 6 Å։ Այս դեպքում ֆերմենտների լրիվ էլեկտրաստատիկ փոխազդեցության էներգիան տատանվել է –30 մինչև 400 կԿալ/մոլ։ Նկարում պատկերված է ինտենսիվության բաշխումը TB էնոլազի ամինաթթվային մնացորդների համար։ Անալիզը ցույց տվեց, որ TB էնոլազի ամենաակտիվ փոխազդող մնացորդների 70% նույնական են խմորասնկի էնոլազի ամինաթթվային մնացորդների հետ։ Մա կարող է հիմք հանդիսանալ այս փոխազդեցությունը դասելու սպեցիֆիկ փոխազդեցությունների շարքին։



Փոխազդեցության ինտենսիվության կախվածությունը Trypanosoma brucei էնոլազի ամինաթթվային հաջորդականությունից։ Քառակուսիներով նշված ամինաթթուները գոյություն ունեն միայն TB էնոլազի մոտ, իսկ եռանկյունիներով նշվածները` նույնական են խմորասնկի էնոլազի մնացորդների հետ։

հնչպես երևում է նկարից, TB էնոլազը ավելի մեծ փոխազդեցության ակտիվություն է ցույց տալիս իր փոքր N-վերջնամասի շրջակայքում (մնացորդներ 1-139) և  $\beta/\alpha$  հատվածի վրա (մնացորդներ 140-149) [7], քան իր C-վերջնամասի շրջակայքում։ Խմորասնկի էնոլազի փոխազդող ամինաթթվային մնացորդներ են շղթայի 200-ից 243 և 274-ից 367 տիրույթներում։ Կատալիտիկ Val153-Phe169 և ասիմետրիկ Ser250-Gln277 շղթաներր [9] թույլ են փոխազդում ֆոսֆոզլիցերատ մուտազի հետ (տվյալները ներկայացված չեն)։ Կատալիտիկ կենտրոնի շրջակայքում թույլ փոխազդեցության պատճառը կարող է լինել Mg<sup>2+</sup> և Zn<sup>2+</sup> իոնների բացակայությունը, որոնք կարևոր դեր են խաղում ֆերմենտի կատալիտիկ ակտիվության մեջ։ Խմորասնկի էնոլազ դիմերի մի կտորի ամենաակտիվ փոխազդող մնացորդները հետևյալն են՝ Arg200, Leu227, Lys233, Asp238, Lys287, Pro290, Glu335, Ala365 և Gly366, որոնք ցույց են տալիս փոխազդեցության բարձր աստիճան ՖԳՄ-ի ակտիվ կենտրոնի շրջակայքի ամինաթթվային մնացորդների հետ։ Նշենք նաև, որ փոխազդեցության զգալի ակտիվություն է գրանցվել իմորասնկի էնոլազի այն դիրքերի համար, երբ էնոլազ դիմերի միայն մի կտորն է փոխազդել ՖԳՄ-ի հետ։ Սակայն ավելի երկար սիմուլյացիոն պրոցեսի դեպքում երկրորդ կտորը կարող է կարևոր դեր խաղալ ֆերմենտի ակտիվության մեջ։

Փորձ է արվել գրանցելու «մետաբոլիկ անցման» ֆենոմենը, որի ընթացքում Ֆ-ից անջատված 2ՖԳ-ն պետք է անցներ էնոլազի մեջ առանց ջրի հետ հավասարակշովելու [1]։ Չնայած, որ խմորասնկի էնոլազը ավելի ակտիվ փոխազդեցություն է ցուցաբերել 2ՖԳ-ի հետ (գրանցվել է 2.13 Å մերձեցում էնոլազի և 2PG-ի միջև), սիմուլյացիոն պրոցոսի 100 պվի (պիկովայրկյան) ընթացքում «մետաբոլիկ անցում» չի գրանցվել։

ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտ

#### D. E. Hakobyan, K. B. Nazaryan

# Computer Modeling of Monomeric and Dimeric Enolase Interaction with Phosphoglycerate Mutas

Glycolytic enzymes are responsible for conversion of glucose to pyruvate. It is well known that glycolytic enzymes can form dynamic complexes and substrate channeling in such complexes may take place. A number of in vitro methods have been used to investigate interaction between enolase and phosphoglycerate mutase. To determine whether this interaction is "visible" with the help of computer modeling method, two different enolases have been chosen from available protein data banks. Saccharomyces Cerevisiae (Sc.) phosphoglycerate mutase and Sc. enolase dimers together with Trypanosoma brucei (TB) enolase monomer have been tested for interaction. Analysis showed that 70% of most active binding amino acid residues of TB enolase are identical to residues of yeast enolase. Nevertheless no channeling has been observed.

## Д. Э. Акопян, К. Б. Назарян

#### Компьютерное моделирование взаимодействия энолазы и фосфоглицерат мутазы

Известно, что ферменты энолаза и фосфоглицерат мутаза участвуют в прямом и обратном превращении глюкозы в пируват. Проведен ряд in vitro экспериментов для выявления и исследования свойств взаимодействия этих ферментов, а также регистрации "метаболического канала". Компьютерное моделирование является новым и многообещающим методом для такого рода исследований. Рассмотрено взаимодействие дрожжевой энолазы и энолазы, выделенной из организма Trypanosoma brucei с дрожжевой фосфоглицерат мутазой. Показано, что самые активные аминокислотные остатки энолазы от Trypanosoma brucei на 70% совпадают с аминокислотными остатками дрожжевой энолазы, что может свидетельствовать о специфичности взаимодействия этих ферментов. Несмотря на наличие взаимодействия, эффект "метаболического канала" не выявлен.

### Գրականություն

1. Ovadi J. - J. Theor. Biol. 1991. V. 152. P. 1-22.

2. Zhang E., Brewer J. M., Minor W, Carreira L. A., Lebioda L. - Biochemistry. 1997. V. 36. P. 12526-12534.

3. Brooks S. P. J., Storey A. C. - FEBS Letters. 1991. V. 278. P. 135-138.

4. Hannaert V., Albert M. A., Ridgen D. J., da Silva Giotto M. T., Opperdoes F. R. - Eur. J. Biochem. 2003. V. 270. P. 3205-3213.

5. Batke J., Nazaryan K. B., Karapetian N. H. - Arch. Biochem. Biophys. 1988. V. 264. P. 510-518.

6. Nazaryan K., Climent F., Simonian S., Tompa P., Batke J. - Arch. Biochem. Biophys. 1992. V. 296. P. 650-653.

7. Crowhurst G. S., Dalby A. R., Isupov M. N., Campbell J. W., Littlechild J. A. - J. Biological Crystallography. 1999. V. 55. P. 1822-1826.

8. Brooks B. R., Bruccoleri R. E., Olafson B. D., States D. J., Swaminathan S., Karplus M. - J. Comp. Chem. 1983. V. 4. P.

9. da Silva Giotto M. T., Hannaert V., Vertommen D., de Navarro M. V., Rider M. H., Michels P. A. M., Garratt R. C., Rigden D. J. - J. Mol. Biol. 2003. V. 331. P. 635-665.

10. Lowe S. L., Adrian C., Ouporov I. V., Waingeh V. F., Thomasson K. A. - Biopolymers. 2003. V. 70. P. 456-470.

11. Ouporov I. V., Knull H. R., Huber A., Thomasson K. A. - Biophys. J. 2001. V. 80. P. 2527-2535.

12. HyperChem<sup>™</sup> Professional 7.51, Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA.

13. Sullivan D. T., MacIntyre R., Fuda N., Fiori J., Barrilla J., Ramizel L. - J. Expr. Biol. 2003. V. 206. P. 2031-2038.

14. Chevalier N., Rigden D. J., Van Roy J., Opperdoes F. R., Michels P. A. M. - Eur. J. Biochem. 2000. V. 267. P. 1464-1472.