

A 03.00.03
A-406

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱՎԱՂԵՍԻԱ
Հ. ԲՈՒՆԻԱԹՅԱՆԻ ԱՆՎԱՆ ԿԵՆՏՐԱԲԻՄԻԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՀԱՎՈՐՅԱՆ ԴԱՎԻԹ ԷԴՎԱՐԴԻ

ԳԼԻԿՈԼԻՏԻԿ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՀԱՄԱՎԱՐԳՉԱՅԻՆ
ՍՈՂԵԼԱՎՈՐՈՒՄ

Գ.00.03 - «Մոլեկուլային և բջջային կենսաբանություն»
մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

Երևան - 2006

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМЕНИ Г. БУНЯТЯНА

АКОПЯН ДАВИД ЭДВАРДОВИЧ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛИКОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ С
ПОМОЩЬЮ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 03.00.03 – "Молекулярная и клеточная биология"

ЕРЕВАН - 2006

Ատենախոսության բեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝ կենս. գիտ. դոկտոր Կ.Բ. Նազարյան
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ քիմ. գիտ. դոկտոր, ֆիզ.-մատ. գիտ. դոկտոր, ՀՀ ԳԱԱ բրբալից անդամ Ա.Ա. Շահինյան
Առաջատար կազմակերպություն՝ կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ. Է.Ս. Գևորգյան
Մ. Հերացու անվան Երևանի պետական բժշկական համալսարան

Պաշտպանությունը կայանալու է «17» մայիսի 2006թ., ժ. 14.00
ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվան Կենսաքիմիայի ինստիտուտին կից 042
Մասնագիտական խորհրդի նիստում, հասցեն՝ 375014, Երևան, Պարույր Սևակի 5/1:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Կենսաքիմիայի ինստիտուտի գրադարանում:

Սեղմագիրը առաքված է «15» ապրիլի 2006թ.

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար
կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ. *Ա.Ա. Սիմոնյան* Ա.Ա. Սիմոնյան

Тема диссертации утверждена на заседании Ученого совета института
Молекулярной биологии НАН РА

Научный руководитель: доктор биол. наук К.Б. Назарян
Официальные оппоненты: доктор хим. наук, доктор физ.-мат. наук, член-корр. НАН Армении А.А. Шагинян
Ведущая организация: доктор биол. наук, проф. Э.С. Геворкян
Ереванский государственный медицинский университет имени М. Гераци

Защита диссертации состоится "17" мая 2006г. в 14.00 часов на заседании
Специализированного Совета 042 при Институте биохимии им. Г. Бунятыана
НАН РА по адресу: 375014, Ереван, ул. Паруйра Севака 5/1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биохимии.

Автореферат разослан "15" апреля 2006г.

Ученый секретарь Специализированного Совета,
доктор биол. наук, проф. *Ա.Ա. Սիմոնյան* Ա.Ա. Սիմոնյան



1514-2006

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Большую часть растворимых ферментов цитоплазмы составляют ферменты, участвующие в гликолизе. В дрожжевой клетке, например, на гликолитические ферменты приходится около 65% всего растворимого белка [Pritchard, Kell (2002), Hess et al. (1969)]. Известно, что фосфогилицерат мутаза (ФГМ) и енолаза последовательные ферменты в гликолизе, которые обратимо катализируют, соответственно, переход 3-фосфогилицерат в 2-фосфогилицерат и дегидратацию 2-фосфогилицерата в фосфоенолпируват.

Существует множество данных об альтернативных функциях этих ферментов. Изофермент ФГМ, биФГМ, катализирующий преобразование 1,3-бифосфогилицерата в 2,3-бифосфогилицерат (2,3-БФГ), играет важную роль в эритроцитах, так как, известно, что 2,3-БФГ - есть аллостерический эффектор, понижающий сродство гемоглобина к кислороду [Rapoport et al. (1950)]. У позвоночных существуют три типа димерных изоферментов енолазы, состоящих из отдельных α , β [Peshavaria et al. (1991)] и γ [Chai et al. (2004)] субъединиц. $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ димерные изоформы встречаются, соответственно, в печени и мышцах, а в мозге возможны как $\alpha\alpha$, $\alpha\gamma$, так и $\gamma\gamma$ изоформы. α -енолаза, служит также плазминогенным рецептором у поверхности различных клеток, связываясь с цитоскелетными и цитохромными структурами [Pancholi et al. (2001)]. Кроме того, зарегистрировано окисление α -енолазы у людей с болезнью Альцгеймера [Castegna et al. (2002)].

Бактерия *Trypanosoma brucei* (ТВ), попадая в кровь животных, "перехватывая" гликолиз за счет высокой скорости преобразования глюкозы в пируват, тем самым, вызывает сонную болезнь, часто с фатальным исходом. Первые семь гликолитических ферментов в клетке ТВ находятся в особой органелле - гликосоме, а ФГМ, енолаза и пируват киназа вне ее [Chevalier et al. (2000), Hannaert et al. (2003)]. Поэтому, ФГМ и енолаза являются важными объектами для исследования путей блокировки гликолиза у ТВ и восстановления гликолиза в клетке хозяина.

Сверхбольшая концентрация гликолитических ферментов в цитоплазме и еще большая их концентрация в митохондриях [Stere (1981)] пока еще не имеет более или менее подтвержденных объяснений. Есть предположение, что значительная часть гликолитических ферментов действуют как аллостерические эффекторы, связываясь с различными структурными компонентами клетки [Waingeh et al. (2006), Batke (1989)]. К сожалению, подавляющее большинство предположений основывается на результатах *in vitro* экспериментов, что ставит под сомнение предполагаемую модель. То же относится к эффекту "направленного переноса" (metabolic channelling) [Cornish-Bowden et al. (2004), Milani et al. (2003)]. Последний занимает

важное место в слабых белковых взаимодействиях, так как является одним из основных узлов регуляции промежуточных процессов преобразования метаболитов [Ovadi (1991)].

Для выяснения вероятности и предусловий комплексообразования гликолитических ферментов необходимо наличие конкретных количественных данных, что остается трудно достижимым в условиях *in vivo*. Компьютерное моделирование занимает все более важную позицию в получении и обработке количественных данных по поведению биологических систем.

Метод молекулярной динамики (МД) является одним из передовых методов исследования поведения биологических структур [Rapaport (1995)]. Существуют многочисленные данные, относящиеся к белок-белок взаимодействиям, полученные методом МД [Elcock et al. (2001), Northrup, Erickson (1992)]. Методом МД проведены исследования для выявления вероятности взаимодействия гликолитических ферментов и эффекта "направленного переноса" для метаболита [Ourogov et al. (2001), Waingeh et al. (2004)].

Данные, полученные методом МД и согласующиеся с результатами экспериментов, являются исключительно важным этапом анализа таких динамических процессов как взаимодействие гликолитических ферментов, что позволяет получить детальную информацию по комплексообразованию ФГМ и енолазы и предугадать поведение системы при различных воздействиях, что на сегодняшний день, невозможно реализовать другими существующими методами.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось исследование функционального взаимодействия гомологичных и гетерологичных гликолитических ферментов ФГМ и енолазы, а также эффекта "направленного переноса" между ними методом молекулярного динамического моделирования.

Для осуществления данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить свойства взаимодействия енолазы различных организмов с ФГМ дрожжей и выявить возможные функциональные различия во взаимодействиях гомологичных и гетерологичных ферментов.
2. Выявить возможное функциональное комплексообразование между *Saccharomyces cerevisiae* ФГМ и енолазой.
3. Определить возможное существование эффекта "направленного переноса" между ФГМ и енолазой, а также необходимые для этого механизма условия.

Научная новизна и практическая ценность. Исследование взаимодействия белков с помощью методов МД дает возможность

установить важные конформационные и функциональные свойства комплексообразования и определить возможные пути активации или ингибирования отдельных ферментов и мультиферментных комплексов.

Впервые исследовано взаимодействие гликолитических ферментов ФГМ и енолазы дрожжей различными методами МД. Выявлено схожее взаимодействие енолазы из различных организмов с дрожжевой ФГМ и показано также существование функционального ФГМ-енолазы комплекса. Данные, полученные по взаимодействию активных центров дрожжевых ФГМ и енолазы, позволяют предположить существование эффекта "направленного переноса" между этими ферментами. Поскольку, такие процессы, как "направленный перенос" (НП – metabolic channelling), являются динамическими процессами, изучение количественных характеристик взаимодействий активных аминокислотных остатков полипептидных цепей ферментов не представляется возможным кинетическими методами. Это обстоятельство подчеркивает важность метода МД при изучении регуляторных свойств слабых взаимодействий.

Основная практическая ценность настоящей работы состоит в выявлении свойств взаимодействия ФГМ и енолазы и определении активных аминокислотных остатков, участвующих в комплексообразовании, воздействие на которые может в значительной степени содействовать функциональному взаимодействию, или наоборот, ингибированию сближения ферментов. Детальные данные по взаимодействию активных центров ферментов дают возможность определить возможные пути активации или ингибирования ФГМ и енолазы в отдельности.

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что анализ взаимодействия ферментов ФГМ и енолазы методом МД и выявление свойств их функционального комплексообразования имеет важное прикладное значение. Полученные результаты по взаимодействию вышеуказанных ферментов, могут служить важнейшим прогнозирующим средством для реальных экспериментов.

Апробация работы. Основные результаты настоящего исследования были доложены и обсуждены на заседании ученого совета Института Молекулярной Биологии НАН РА и представлены на 30-ой международной конференции FEBS 2005 (Будапешт, Венгрия), 50-ой ежегодной национальной биофизической конференции 2006 (Солт Лейк Сити, США).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 научных работ. **Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 105 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Работа содержит 22 рисунка и 5 таблиц. Библиографический указатель включает 171 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. Работа выполнена в Институте молекулярной биологии, НАН Армении.

Объектами проводимых исследований служили модели трехмерных кристаллических структур гликолитических ферментов — фосфоглицерат мутазы и енолазы дрожжей, *Trypanosoma brucei* и нейроспецифической енолазы человека.

В сконструированных системах были использованы трехмерные координаты ферментов ФГМ и енолазы, которые можно найти в общедоступной Интернет базе белков (Proteins Data Bank) [Berman et al. (2001)]. Использовались ФГМ (PDB код - 1QHF) и енолаза (2ONE) [Zhang et al. (1997)] дрожжей, а также енолаза из *Trypanosoma brucei* (1OEP) [Hannaert et al. (2003)] и головного мозга человека (1TE6) [Chai et al. (2004)].

Промежуточные метаболиты, изначально находящиеся в структурах енолазы были удалены для освобождения активных центров. Два 3-фосфоглицерата в исходной структуре ФГМ были преобразованы в 2-фосфоглицераты для выявления пост-каталитической активности фермента.

Программный пакет Nuregchem версии 7.5 использовался для преобразования субстратов и удаления ненужных метаболитов из начальных структур, соответственно, ФГМ и енолазы.

Программный пакет CHARMM версии c31b1 [Brooks et al. (1983)], был использован для конструирования всех моделей. С его помощью были распределены заряды составных аминокислот ферментов, а именно, аргинину и лизину были приписаны заряды +1e (в единицах заряда электрона), аспарагиновой и глутаминовой кислотам -1e, а всем остальным аминокислотам заряд 0e. Исключение составляли только остатки гистидина в активных центрах ферментов (Гис8 для ФГМ и Гис159/Гис157, соответственно, для енолазы дрожжей и *Trypanosoma brucei*), которым был приписан заряд +1e. CHARMM также использовался для сольватации ферментов, ионизации среды, минимизации потенциальной энергии сконструированных моделей, MD моделирования и для обработки полученных данных.

Программный пакет VMD [Humphrey et al. (1996)] был использован для графической визуализации ферментов и других компонентов систем.

Для моделирования микросреды ферментов программой CHARMM была подготовлена водяная коробка куда были помещены ферменты ФГМ и енолаза. Для молекул воды была выбрана модель TIP3.

Для ионизации воды были использованы модели ионов Na^+ и Cl^- , концентрацией 150мМ, что соответствует физиологическим условиям живой клетки. Кроме того, ионы Na^+Cl^- использовались для приведения полного заряда системы к нулю и получения нормальной pH среды.

Моделирование систем с явными молекулами воды было проведено на специальном суперкомпьютере (кластер был любезно предоставлен Институтом Информатики и Проблем Автоматизации) с параллельным использованием 32 процессоров с частотой 3.2 ГГц.

Моделирование систем с неявными молекулами воды было проведено на компьютере с частотой 2.4 ГГц.

Были смоделированы три основные системы.

Первая система включала в себя две модели. В первой модели участвовали дрожжевые ФГМ и енолаза, помещенные в водяную коробку, размерами $151 \times 116 \times 102 \text{ \AA}$. Во второй - в водяную коробку с теми же размерами были помещены дрожжевая ФГМ и енолаза *Trypanosoma brucei* (TB). Для сравнения картин взаимодействия и выявления активно взаимодействующих аминокислотных остатков этих двух енолаз, было промоделировано 100 пикосекунд (пс) биологического времени для обеих моделей с разными ориентациями (всего 34).

Во второй системе были исследованы ферменты дрожжевой ФГМ и енолазы, а также дрожжевой ФГМ и нейроспецифической γ -енолазы (HSE) человека. В этом случае обе сконструированные системы включали только молекулы ферментов, а неявная водяная среда была включена в расчет, используя одну из новейших методов MD, EEF1 (Effective Energy Function 1). Эта система была создана для выявления благоприятных ориентаций ФГМ и енолазы, а также для исследования различий во взаимодействии дрожжевой и нейрональной енолаз с ФГМ. Было промоделировано 50 пс биологического времени для обеих моделей с разными ориентациями ферментов (всего 16).

В третьей системе в ионизированный (150мМ Na^+Cl^-) водяной куб с размерами $173 \times 173 \times 173 \text{ \AA}$, были помещены дрожжевые ФГМ и енолаза. В отличии от первой системы, здесь были исследованы всего три ориентации ФГМ и енолазы, где активные центры ферментов были ориентированы преимущественно друг к другу. Для определения функционального комплексообразования ферментов и выявления эффекта "направленного переноса" между ними было промоделировано 3 наносекунд (нс) биологического времени для всех трех ориентаций.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Большая часть исследований была проведена с использованием модели дрожжевых гликолитических ферментов. Такой выбор был обоснован следующими обстоятельствами.

1. Гликолитические ферменты и их особенности наиболее детально исследованы у дрожжей. Это позволяет строить разнообразные компьютерные модели для исследования особенностей ферментов и их взаимодействий.

2. Большинство гликолитических ферментов, в частности ФГМ и енолаза, на 60-63% идентичны или на 70-73% схожи с ФГМ и енолазой млекопитающих [Wang et al. (2004), Chai et al. (2004)]. Дрожжевые ферменты имеют также высокий процент идентичности с гликолитическими ферментами таких протозойных организмов, как *Trypanosoma brucei* (ТВ), которые являются серьезной угрозой для людей и животных, обитающих в южно-африканских странах. Более того, во многих случаях различия между аминокислотными остатками ферментов дрожжей и человека проявляются на участках, далеких, как от активных центров, так и от узлов, взаимодействующих с другими белками. Это дает основание, обобщая данные, полученные для взаимодействия гликолитических ферментов дрожжей, экстраполировать их на ферменты других организмов.
3. В связи с тем, что дрожжи, как объект лабораторных исследований, легко доступны, то проверка прогнозируемых результатов, полученных методом молекулярной динамики (МД), становится сравнительно легко осуществимой.

Первая система. Свойства взаимодействия енолазы

Целью моделирования первой системы было определение активно-взаимодействующих аминокислотных остатков дрожжевой и ТВ енолаз с ФГМ дрожжей и выявление схожести взаимодействия мономерной и димерной енолаз. Общее время моделирования составило 28224 процессорного времени. Были выявлены наиболее активно взаимодействующие аминокислотные остатки дрожжевой и ТВ енолаз. Эта активность для каждого остатка определялась числом случаев, когда данный аминокислотный остаток находился от ФГМ ближе, чем на 6 Å. Для ТВ енолазы наиболее активные аминокислотные остатки находятся в N-концевой части цепи (аминокислоты 1-139) и β/α участка (аминокислоты 140-149).

На рис. 1 представлена интенсивность взаимодействия ТВ енолазы с дрожжевой ФГМ. Как видно, 70% наиболее активно взаимодействующих остатков ТВ енолазы идентичны остаткам дрожжевой енолазы. Это свидетельствует в пользу схожести взаимодействий мономерной ТВ и дрожжевой димерной енолаз с ФГМ.

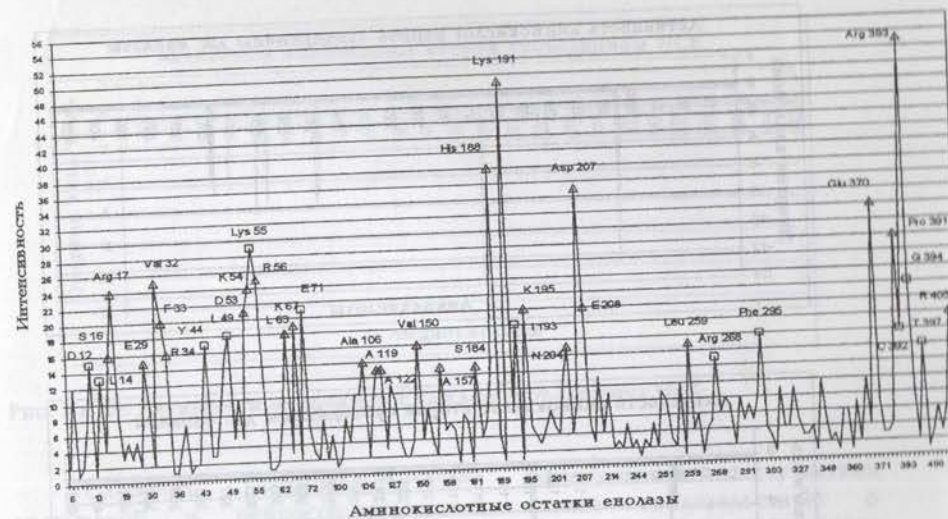


Рис. 1. Зависимость интенсивности взаимодействия ТВ енолазы от аминокислотной последовательности. Аминокислотные остатки, отмеченные квадратами, существуют только у ТВ енолазы, а аминокислоты с треугольниками идентичны аминокислотам дрожжевой енолазы.

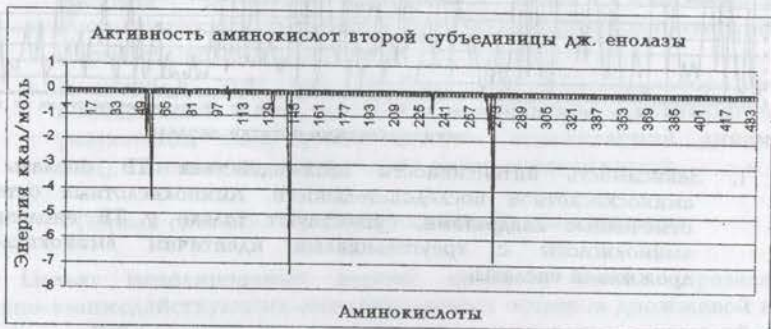
Так как выявление активных аминокислотных остатков енолазы проведением считки случаев, при которых остатки находились в пределах 6 Å от ФГМ, дает слишком общий результат, то была сконструирована вторая система.

Вторая система. Свойства взаимодействия енолазы

Как и в предыдущей, в этой модели участвовали две пары ферментов. Первую пару составляли также дрожжевые ФГМ и енолаза, а вторую - дрожжевая ФГМ и нейроспецифическая енолаза (НСЕ) [Waingeh et al. (2004)]. Для каждой пары были определены 16 ориентаций ферментов. 50 пс МД моделирование было проведено для каждой ориентации с использованием метода EEF1. В результате были выявлены активности взаимодействия всех аминокислот каждой субъединицы дрожжевой и нейроспецифической енолаз (рис. 2 и 3 соответственно).



а



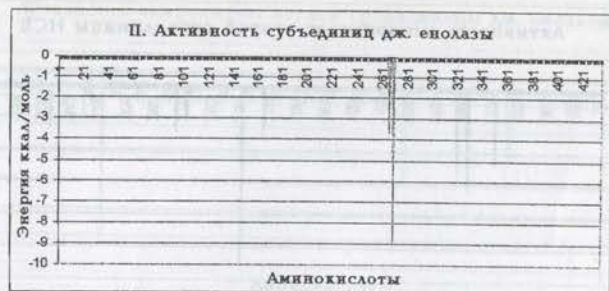
б

Рис. 2(а, б). Активности аминокислот каждой субъединицы Дрожжевой енолазы.

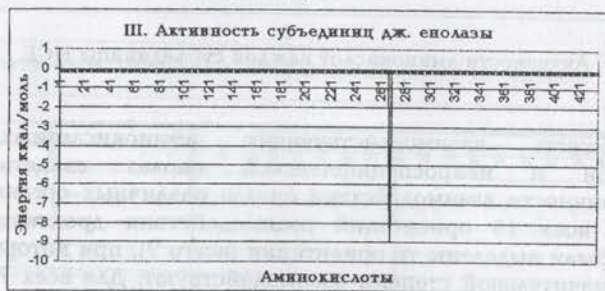


а

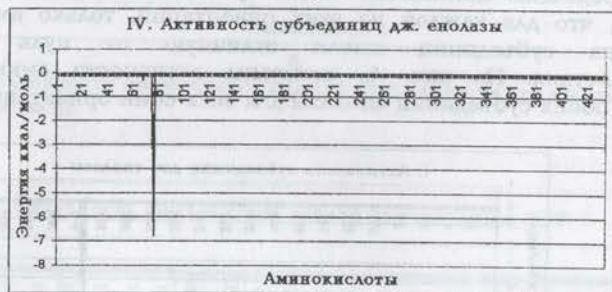




б



в



г



а



е



ж

Рис. 4(а-ж). Активность субъединиц дрожжевой енолазы. Каждый график содержит две кривых (с черным и серым цветами), которые соответствуют разным субъединицам.

Как можно заметить из Рис. 4(а-ж), в каждом графике только одна из кривых имеет отличные от нуля пики, что свидетельствует о том, что для каждой из семи ориентаций, только одна субъединица енолазы взаимодействует с ФГМ.

Третья система. Функциональное комплексообразование ФГМ и енолазы

Для более детального исследования возможного функционального комплексообразования ФГМ и енолазы была сконструирована третья система. ФГМ и енолаза дрожжей были помещены в водный раствор, с ионами Na^+Cl^- (концентрацией 150мМ). За счет рассмотрения малого числа ориентаций ФГМ и енолазы стало возможным достижение времени симуляции до 3 нс. На рис. 5 (а, б, в) представлены начальные конфигурации ферментов. Во всех ориентациях активные центры енолазы были ориентированы преимущественно к одному или обоим активным центрам ФГМ для исследования функционального комплексообразования. На рис. 6 (а, б, в) показаны конформационные

изменения соответствующих начальных ориентаций ферментов после трех наносекундных симуляций.

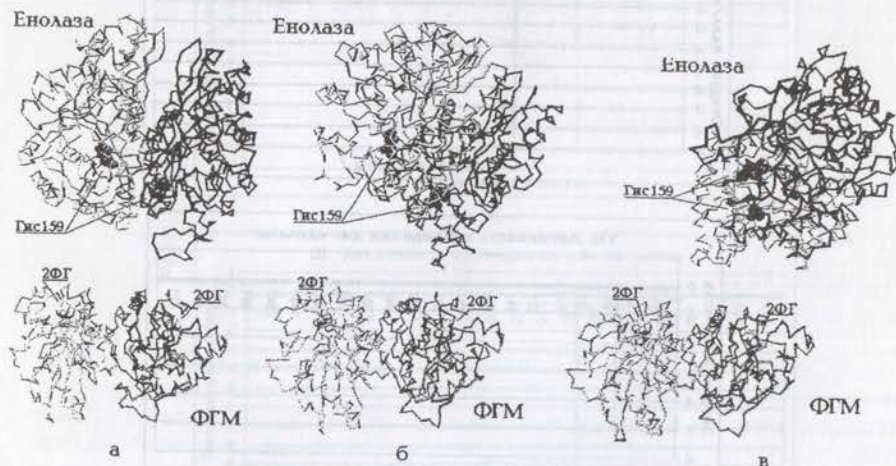


Рис. 5 (а, б, в). Начальные ориентации ферментов, где указаны также активные центры енолазы и два субстрата 2ФГ около активных центров ФГМ.

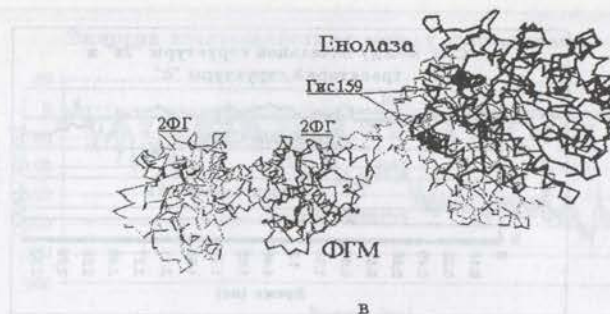
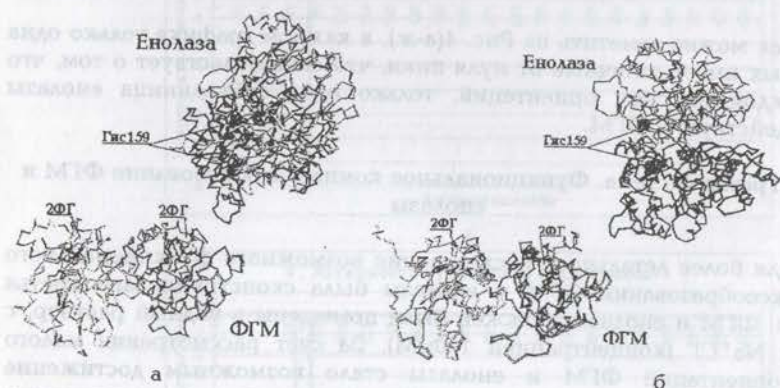
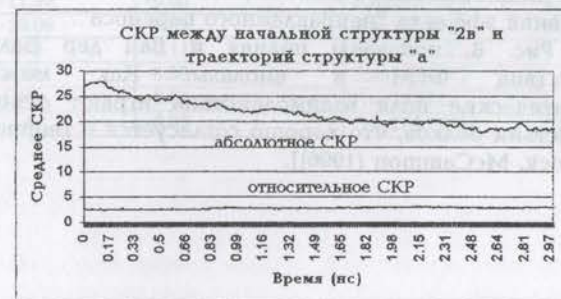


Рис. 6(а-в). Конечные ориентации ферментов (соответственно начальных структур 5а, 5б и 5в), после 3нс симуляции.

Из рис. 6в очевидно, что при определенных ориентациях ферменты склонны взаимодействовать своими околоактивными участками, что принято считать достаточным условием для существования "направленного переноса", а конкретнее, эффекта "прямого переноса" (direct transfer).

Кроме того из рисунков 5в, 6а и 6б видно, что конечные ориентации структур 6а и 6б сходны с начальной ориентацией структуры 5в. Следовательно, можно ожидать, что дальнейшее развитие структур 6а и 6б будет подобно структуре 5в, то есть, приведет к такому же комплексообразованию ферментов, которое наблюдается на рис. 6в. Для точной оценки тенденции сходимости ориентаций 5а и 5б к 5в было вычислено средне-квадратическое расхождение (СКР) между координатами всех траекторий структур "а" и "б", и координатами начальной структуры "в". На рис. 7(а, б), показаны средне-квадратические расхождения енолаз обеих структур "а" и "б" в течении всего симуляционного периода, где в качестве эталонных координат служили координаты начальной структуры "в" (рис. 5в).



а



6

Рис. 7(а, б). Абсолютные и относительные СКР для траекторий структур "а" и "б" по сравнению со начальной структурой "в".

Вычислены, как абсолютные так и относительные СКР. Абсолютное СКР включает абсолютную разницу в координатах (принимая во внимание как вращение, так и перемещение). В случае относительного СКР было принято во внимание только внутренние конформационные изменения енолазы (исключая вращение и перемещение енолазы). Как видно из графиков, относительное СКР в течении всего периода симуляции можно считать неизменным. Уменьшение абсолютной СКР со временем свидетельствует о том, что структуры "а" и "б", по ориентации енолазы приближаются к начальной структуре "в". Следовательно, есть значительная вероятность того, что дальнейшее конформационное изменение структур "а" и "б" будет идти по пути конформационного изменения структуры "в". Это приведет к тому же функциональному комплексообразованию, которое показано на рис. 6в.

Эти данные приводят к важному заключению о существовании ряда ориентаций ферментов ФГМ и енолазы, во время которых они создают функциональный комплекс, что является явным предусловием существования эффекта "направленного переноса".

На Рис. 8, показаны полная и Ван дер Вальсова энергии взаимодействия ФГМ и енолазы. Как можно заметить, электростатические поля взаимодействия играют основную роль во взаимодействии белков, что хорошо согласуется с теорией [Elcock et al. (1996), Elcock, McCammon (1996)].



Рис. 8. Полная и Ван дер Вальсова энергии взаимодействия ферментов на протяжении всего периода симуляции.

В таблицах I и II показаны взаимодействия аминокислотных остатков ФГМ с енолазой, а также енолазы с ФГМ, после 1.5 нс симуляции. Первая колонка представляет аминокислотные остатки фермента, которые с определенной энергией (вторая и третья колонки) взаимодействуют с другим ферментом (четвертая колонка). Последняя колонка содержит минимальные расстояния между взаимодействующими остатками первого фермента (первая колонка) и вторым ферментом (четвертая колонка).

Таблица I. Наиболее активно взаимодействующие остатки ФГМ и их соответствующие энергии, после 1.5 нс симуляции. $E_{\text{доляе}} = -100$ ккал/моль.

Остаток:атом второй субъединицы ФГМ	Электростат. энергия (ккал/моль)	Ван дер Вальсова энергия (ккал/моль)	Остаток:атом первой субъединицы енолазы	Минимальная расстояние в Å
Лиз202:HZ3	-57.52	0.35	Асп255:OD1	1.85
Арг114:HN12	-45.08	0.81	Асп255:OD1	1.78
Лиз30:HE2	18.75	-0.49	Лиз269:HZ3	3.02
Глу34:OE2	-11.99	-0.06	Лиз269:HZ2	5.35
Глу106:OE1	-10.06	-0.62	Лиз254:HE2	3.92
Асп14:OD1	-3.55	-0.11	Лиз269:HZ2	5.04
Гли10:NE2	3.50	-0.36	Лиз269:HZ2	4.04
Лиз103:HZ2	2.96	-0.01	Лиз53:HZ3	7.27
Глу15:HG2	-2.47	-0.05	Лиз269:HZ1	6.36

Таблица II. Наиболее активно взаимодействующие остатки енолазы и их соответствующие энергии после 1.5 нс симуляции. $E_{\text{полная}} = -100$ ккал/моль.

Остаток: атом первой субъединицы енолазы	Электростат. энергия (ккал/моль)	Ван дер Вальсова энергия (ккал/моль)	Остаток: атом второй субъединицы ФГМ	Минимальная расстояние в Å
Асп255:OD1	-106.62	-0.17	Арг114:НН12	1.78
Лиз254:HE2	-13.69	-0.57	Глу106:OE1	3.92
Лиз257:HZ2	-5.59	-0.3	Гли236:O	4.34
Лиз53:HZ3	2.91	-0.01	Лиз103:HZ2	7.27
Асп264:НА	-1.83	-0.55	Лиз102:HE2	3.79
Фен253:HE2	2.25	-0.06	Лиз202:HZ1	5.87

Арг7-Фен19, Лей27-Арг37, Лиз97-Сер115 и Ала198-Иле209 наиболее активные участки взаимодействия ФГМ фермента. Для енолазы взаимодействие ограничивается участком Сер249-Сер270, который содержит один из каталитических узлов Асп255-Асп266 [Zhang et al. (1997)]. Из таблиц I и II видно, что Асп255 енолазы, в основном, взаимодействует с Арг114 и Лиз202 ФГМ. Энергия отталкивания между остатками Лиз30 и Лиз269, соответственно, ФГМ и енолазы, почти полностью компенсируется энергией притягивания между остатками Глу34 ФГМ и тем же остатком Лиз269 енолазы. Глу106 ФГМ и Лиз254 енолазы, также, показывают высокую активность взаимодействия. Как можно заметить из Ван дер Вальсовой энергии взаимодействия, после 1.5 нс симуляции наблюдается слабая гидрофобная активность между ферментами. Было зарегистрировано лишь две водородные связи: Гли236:O...HZ2—Лиз257:NZ и Ала:238:O...HZ1—Лиз257:NZ, с соответствующими длинами 2.02 и 1.66 Å. Остатки Лиз202 ФГМ и Асп255 енолазы, также как, остатки Арг114 и Асп255, Глу34 и Лиз269, Глу106 и Лиз254, Глу15 и Лиз269 формируют солевые мостики, что имеет определенный вклад в связывании двух ферментов.

В таблицах III и IV, подобно таблицам I и II, показаны взаимодействия аминокислотных остатков ферментов после 3 нс симуляции.

Таблица III. Наиболее активно взаимодействующие остатки ФГМ и их соответствующие энергии после 3 нс симуляции. $E_{\text{полная}} = -200$ ккал/моль.

Остаток: атом второй субъединицы ФГМ	Электростат. энергия (ккал/моль)	Ван дер Вальсова энергия (ккал/моль)	Остаток: атом первой субъединицы енолазы	Минимальная расстояние в Å
Лиз202:HZ2	-59.56	2.22	Асп255:OD2	1.58
Глу106:OE1	-53.16	-2.15	Лиз254:HZ1	1.66
Арг114:НН12	-38.38	-0.65	Асп255:OD1	1.94
Лиз97:HZ3	-32.57	-1.2	Асп268:OD1	3.72
Арг113:НН12	-7.87	-0.19	Сер267:OG	5.22
Ала239:НА2	-6.05	-1.97	Асп268:HG1	2.57
Лиз30:HZ1	7.3	-0.03	Лиз269:HE2	5.64
Лей101:НВ1	-1.19	-4.44	Про265:HG1	2.24
Вал240:HG13	-0.73	-4.13	Трп272:HZ3	2.46
Асп110:HD21	4.02	-0.69	Сер267:HG1	2.71
Асп17:OD1	3.51	-0.21	Асп268:OD1	5.38
Асп14:HD21	2.44	-0.07	Асп268:OD1	6.13

Таблица IV. Наиболее активно взаимодействующие остатки енолазы и их соответствующие энергии после 3 нс симуляции. $E_{\text{полная}} = -200$ ккал/моль.

Остаток: атом первой субъединицы енолазы	Электростат. энергия (ккал/моль)	Ван дер Вальсова энергия (ккал/моль)	Остаток: атом второй субъединицы ФГМ	Минимальная расстояние в Å
Асп255:OD2	-103.36	1.76	Лиз202:HZ2	1.58
Лиз254:HZ1	-73.93	1.52	Глу106:OE1	1.66
Асп268:O	-25.46	-2.43	Ала239:НА	2.57
Асп259:OD2	15.31	-0.13	Глу106:OE1	4.77
Сер267:O	-8.43	-3.39	Ала239:НВ3	2.69
Лиз257:HZ2	8.82	-0.25	Вал240:HG22	4.16
Про265:HG1	-1.67	-6.41	Лей101:НВ1	2.24
Асп264:O	5.58	-0.62	Глу106:OE1	4.15
Фен262:O	5.15	-0.27	Глу106:OE2	4.46
Лиз263:НА	-3.48	-0.22	Глу106:OE2	5.72
Лиз269:НА	3.25	-0.9	Ала239:НА	4.4
Фен253:HZ	2.15	-0.04	Лиз202:HZ3	6.42

Можно заметить, что после дополнительной 1.5 нс симуляции, Глу106 ФГМ и Лиз254 енолазы, по силе взаимодействия, переместились на более высокую позицию. Разница в энергии взаимодействия между Глу106 и Лиз254, представленных в таблицах III и IV, является следствием энергии отталкивания между Глу106 и Асп259. Можно заметить явное увеличение гидрофобных взаимодействий между остатками Ала239 ФГМ и Асп268 енолазы, также как, между остатками Ала239 и Сер267, Лей101 и Про265, Вал240 и Трп272. Были также зарегистрированы следующие водородные связи между ФГМ и енолазой, с соответствующими длинами: Глу106:OE1...HZ1—Лиз254:NZ с длиной 1.67 Å, Глу106:OE2...HZ1—Лиз254:NZ с 2.13 Å, Арг114:НН1—НН12...Асп255:OD1 с 1.94 Å, Арг114:НН2—НН21...Асп255:OD2 с 2.4 Å,

Лиз202:NZ—HZ2—Асп255:OD2 с 1.59 Å, Лиз202:NZ—HZ1—Асп255:OD2 с 1.97 Å. Вал240:N—HN, также вступает в водородную связь с Асп268:O и Лиз269:O енолазы. Лиз97 ФГМ и Асп268 енолазы формируют солевой мостик. Аминокислоты С-концевого участка (Глу231-Вал240) ФГМ проявляют связывающую активность с енолазой после 3 нс симуляции. Этот участок частично перекрывает выход в среду для 2ФГ [Walter et al. (1999)] и взаимодействие С-концевого участка ФГМ является необходимым условием для существования "направленного переноса".

Кроме того были выявлены формирования водородных связей между ферментами на протяжении всего периода симуляции. На рис. 9, показана временная диаграмма числа образованных водородных связей для каждой траектории (траектории были запомнены с интервалом в 2 пс).



Рис. 9. Временная диаграмма числа водородных связей для всего периода симуляции.

Очевидно, увеличение водородных связей со временем, что несомненно является важным фактором при взаимодействии и связывании белков.

Полученные данные свидетельствуют о том, что активные центры дрожжевых ФГМ и енолазы для ряда ориентаций образуют функциональный комплекс.

Результаты позволяют предположить, что для существования "направленного переноса" между дрожжевой ФГМ и енолазой необходимо, чтобы такие отрицательно заряженные аминокислоты, как Асп255 и Асп268, образовывали "желоб", в котором положительно заряженные Лиз257 и Лиз269 создали бы положительное электростатическое поле для притяжения 2ФГ субстрата. То, что у НСЕ вместо Лиз269 занимает аминокислота с нейтральной R-группой, может быть причиной того, что в нейронах, даже при связывании активных центров ФГМ и енолазы, перехода 2ФГ субстрата от ФГМ к енолазе не

произойдет. Это может служить объяснением того, что в нейронах ФГМ-енолаза комплекс ингибирует активность енолазы [Batke et al. (1988)].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В современной медицине все больше внимания уделяется исследованиям механизмов регуляции ферментов, действующих на уровне конкретных аминокислотных остатков. Такие целевые способы воздействия позволяют наиболее эффективно активизировать или подавить конкретный процесс, не воздействуя при этом на другие. Это особенно важно для случаев, когда в инфицированном организме ферменты бактерий схожи по строению с ферментами клеток хозяина. Так, известно, что причиной сонной болезни у животных и человека в Южной Африке является протозойный организм *Trypanosoma brucei*, который попадая в кровь, почти полностью подавляет гликолиз в клетках хозяина [Hannaert et al. (2003); da Silva Giotto et al. (2003); Chevalier et al. (2000)]. Исследования показали, что гликолитические ферменты *Trypanosoma brucei* на 60-70% идентичны гликолитическим ферментам человека. Для устранения болезни необходимо детальное исследование почти каждого аминокислотного остатка полипептидной цепи ферментов и, что особенно важно, выявление конкретных различий во взаимодействиях гликолитических ферментов у обоих организмов.

Исследование и понимание процессов взаимодействия гликолитических ферментов, также как выявление условий существования эффекта "направленного переноса" (перенос метаболита из активного центра одного фермента, в активный центр второго) являются одной из важнейших задач современной энзимологии [Waingeh et al. (2006); Cornish-Bowden et al. (2004); Milani et al. (2003); Sullivan et al. (2003); Ovadi (1991)]. В связи с тем, что взаимодействия гликолитических ферментов являются слабыми и кратковременными, на сегодняшний день существующие *in vivo* методы, позволяющие исследовать их взаимодействие, очень ограничены. Существующие кинетические и другие усовершенствованные теоретические методы [Fell (2005); Wang et al (2004); Visser et al. (2003); Lambeth et al. (2002); Cornish-Bowden et al. (2001)] позволяют оценивать вероятность воздействия того или иного параметра на поведение исследуемой системы. К сожалению, существующие кинетические методы основываются на кинетически усредненных входных параметрах и их использование для определения таких динамических процессов, как механизм "направленного переноса" подразумевает применение нетривиального математического аппарата. Кроме того, используя кинетические методы, невозможно получить поведение взаимодействующих аминокислотных остатков, что является несомненно важным элементом в процессе создания эффективных регуляторных механизмов.

Методы молекулярной и броуновой (Brownian) динамики являются одним из последних методов компьютерного моделирования [Elcock (2002); Elcock et al. (2001); Rapoport (1995); Northrup et al. (1992)]. С их помощью становится в частности возможным детальное исследование белок-белковых, белок-мембранных и белок-ДНК взаимодействий. Метод молекулярной динамики (МД) позволяет исследовать поведение всей системы на уровне каждого составляющего атома. Методом МД были изучены свойства взаимодействия альдолазы и глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназы (ГАРД) и оценена вероятность существования НП [Ourogov et al. (2001)]. Были исследованы также взаимодействия альдолазы и ГАРД с F-актином [Waingeh et al. (2004); Lowe et al. (2003)].

Фосфоглицерат мутаза (ФГМ) и енолаза являются важными ферментами как в гликолизе так и ряде других процессов. Известно, что 2-бифосфоглицерат продукт изофермента ФГМ играет важную роль в связывании кислорода к гемоглобину [Rapoport et al. (1950)]: Существуют данные о об окисление α -енолазы у людей с болезнью Альцгеймера [Castegna et al. (2002)]. Также, было показано, что взаимодействие нейроспецифической γ -енолазы (НСЕ) и ФГМ, в значительной степени ингибирует каталитическую активность НСЕ [Batke et al. (1988)].

В нашей лаборатории, при помощи методов МД и Броуновой динамики было исследовано взаимодействие ФГМ и енолазы и изучена вероятность существования НП между ними. МД моделирования проводились на трехмерных моделях кристаллических структур ферментов ФГМ и енолазы дрожжей, также как енолазы *Trypanosoma brucei* и нейроспецифической енолазы. Весь процесс моделирования и анализ полученных данных был осуществлен программным пакетом CHARMM [Brooks et al. (1983)]. Были сконструированы несколько основных моделей с различными ориентациями ферментов и использованием, как явных, так и неявных моделей водяной среды и ионов соли. Особенно детально была изучена возможность функционального комплексообразования между ФГМ и енолазой. Подавляющая часть МД моделирования была проведена на специальном суперкомпьютере (кластер) предоставленном Институтом информатики и проблем автоматизации НАН.

Результаты анализов взаимодействий изоферментов енолазы показали малую специфичность во взаимодействии енолаз различных организмов с ФГМ дрожжей. Выявилась четкая особенность комплексообразования ФГМ и енолазы, а именно, ФГМ и енолаза проявляют значительную взаимодействующую активность только в тех случаях, когда взаимодействует только одна из субъединиц от каждого фермента. Детальное изучение возможного функционального комплексообразования между ФГМ и енолазой показало, что существует ряд ориентаций, когда активные центры ФГМ и енолазы образуют комплекс. Хотя считается, что такое взаимодействие является

достаточным условием для существования НП [Batke (1989)], тем не менее мы предполагаем, что возможное комплексообразование между активными центрами ферментов не всегда сопровождается "туннелированием" субстрата. Изучены различия во взаимодействии различных изоферментов енолазы с дрожжевой ФГМ. Определены различия в аминокислотах дрожжевой енолазы и НСЕ, которые играют важную роль при взаимодействии с ФГМ, а также при осуществлении НП. Показано, что вместо аминокислот Asp268 и Lys254 дрожжевой енолазы, у НСЕ занимают Pro266 и Arg252, соответственно. Остатки Lys254 и Arg252 у дрожжевой и нейроспецифической енолаз, соответственно, можно считать идентичными с точки зрения активности взаимодействия с ФГМ, так как оба остатка имеют положительный заряд. Несмотря на то, что аминокислота Asp268 у дрожжевой енолазы является одной из самых активных остатков при взаимодействии с ФГМ, тем не менее ее отсутствие у НСЕ не должно значительно сказываться на активности функционального комплексообразования в целом. С другой стороны, вместо дрожжевой аминокислоты Lys269, у НСЕ находится Ser267. Эта разница может играть огромную роль при связывании енолазы с 2ФГ, так как было показано, что дрожжевые остатки Lys257 и Lys269 являются основными остатками, которые могли бы инициировать переход 2ФГ от ФГМ к енолазе. В этом плане, отсутствие Lys269 у НСЕ может служить причиной того, что НСЕ и ФГМ могут связываться своими активными центрами, но при этом не будет происходить перехода 2ФГ от ФГМ к НСЕ. Это может объяснить наблюдаемое ингибирование НСЕ при комплексообразовании с ФГМ [Batke et al. (1988)]. Принимая, также, во внимание, что добавление 2ФГ к экстрагированным НСЕ и ФГМ снова активизирует НСЕ [Batke et al. (1989)], то можно предположить, что в нейронах функциональное комплексообразование между ФГМ и енолазой не происходит и 2ФГ связывается с НСЕ в результате свободной диффузии.

ВЫВОДЫ

С целью исследования свойств взаимодействия и возможного механизма НП между ФГМ и енолазой нами было проведено МД моделирование с использованием модели дрожжевой ФГМ и енолаз дрожжей, *Trypanosoma brucei* и нейронов. Полученные результаты исследования позволили сделать следующие выводы:

1. Схожее взаимодействия енолаз из дрожжей, *Trypanosoma brucei* и нейронов с дрожжевой ФГМ свидетельствует о том, что предусловия для енолаза-мутаза комплексообразования у дрожжей и позвоночных одинаковы.
2. Димерные ФГМ и енолаза проявляют активность к взаимодействию, когда только одна из субъединиц

каждого фермента взаимодействует с субъединицей другого фермента.

3. Для ряда ориентаций, дрожжевая ФГМ и енолаза взаимодействуют друг с другом своими активными центрами. Взаимодействие активных центров ферментов, взаимодействие С-концевого участка ФГМ с енолазой, также как, присутствие у енолазы аминокислотных остатков Lys257 и Lys269, можно считать достаточным, для того, чтобы между дрожжевыми ФГМ и енолазой существовал эффект "направленного переноса".
4. В отличие от дрожжевой енолазы, у нейроспецифической енолазы место Lys269 занимает другая аминокислота с нейтральной R-группой, что может служить причиной того, что несмотря на взаимодействие активных центров нейроспецифической ФГМ и енолазы, переноса 2-фосфолипидат субстрата от ФГМ к енолазе не происходит и 2-фосфолипидат остается связанным с ФГМ. Можно заключить, что в нейронах, функциональная связь между ФГМ и енолазой слабая и вероятность "направленного переноса" мала.
5. Енолаза-мутаза функциональная связь, и существование между ними механизма "направленного переноса" может варьировать в широких пределах, даже для изоферментов одного и того же организма.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Դ. Է. Հակոբյան, Վ. Ք. Նազարյան, Էնոլազի և ֆոսֆոգլիցերատ մուտազի փոխազդեցության համակարգչային մոդելավորում, ՀՀ ԳԱԱ Ձեկույցներ, 2005, 105, 283-287.
2. Д. Э. Акоюян, Взаимодействие фосфолипидат мутаза и енолазы и выявление эффекта туннелирования при помощи компьютерной симуляции, НАН Биол. Журн. Армении, 2005, 3-4(57), 208-214.
3. D. Hakobyan, Computer simulation of complex formation between glycolytic enzymes, Med. Sci. Armenia, 2005, 4, 49-52.
4. Molecular Dynamics Simulation of Interactions in Glycolytic Enzymes, Biochemistry (Moscow), 2006, 71(4), 370-376.
5. D. Hakobyan, K. Nazaryan, Investigation of Interaction between Enolase and Phosphoglycerate Mutase using Molecular Dynamics Simulation, J. Biol. Struct. Dyn., 2006, 23(6), 625-634.
6. Компьютерное моделирование взаимодействия гликолитических ферментов, ЕрГМУ 75 - Материалы международной научной конференции, 2005, 55-56.

7. D. Hakobyan, K. Nazaryan, Investigation of enolase and phosphoglycerate mutase interaction using molecular dynamics simulation, FEBS Journal, 2005, 272 (s1), G3-013P.
8. D. Hakobyan, K. Nazaryan, Molecular dynamics simulation of complex formation and possibility of channelling between Phosphoglycerate Mutase and Enolase, Biophys. J., 2006, 2131-Pos/B479.

ԱՄՓՈՓՈՒՄ

Գլիկոլիտիկ ֆերմենտների վերմոլեկուլային կազմավորմանը, ինչպես նաև «մետաբոլիկ տեղափոխմանը» վերաբերվող հարցերը մոլեկուլային կենսաբանության կարևորագույն և դեռևս չպարզաբանված խնդիրներից են, որոնց բացահայտումը խիստ կարևոր է բջջի նյութափոխանակության կարգավորման համար: Բջջում ֆերմենտների միջև մետաբոլիտների տեղափոխումը *in vivo* կարող է ընթանալ, ինչպես ազատ դիֆուզիայի, այնպես էլ «մետաբոլիկ տեղափոխման» մեխանիզմներով: Այդ պատճառով չափազանց կարևոր է իմանալ ֆերմենտների փոխազդեցության առանձնահատկությունները, որոնք հնարավորություն կտան ստեղծելու արդյունավետ կարգավորման մեթոդներ: Գլիկոլիտիկ ֆերմենտների միջև փոխազդեցությունները պատկանում են թույլ փոխազդեցությունների դասին, որոնց ուսումնասիրման համար գոյություն ունեցող *in vivo* մեթոդները խիստ սահմանափակ են:

Մոլեկուլային դինամիկ (ՄԴ) մոդելավորման օգնությամբ հնարավոր է դառնում ուսումնասիրել կենսաբանական համակարգի վարքը *in vivo* պայմաններին մոտ: Այս մեթոդը անփոխարինելի է թույլ փոխազդեցությունների և «մետաբոլիկ տեղափոխման» մեխանիզմի առանձնահատկությունների բացահայտման գործում, քանի որ հնարավորություն է ընձեռնում ստանալու կենսաբանական համակարգը կազմավորող յուրաքանչյուր ատոմի վարքը:

Առաջին անգամ ՄԴ մոդելավորման մեթոդով ուսումնասիրվել է ֆոսֆոգլիցերատ մուտազի (ՖԳՄ) և էնոլազի փոխազդեցությունը: Տարբեր օրգանիզմների ՖԳՄ-ի և էնոլազի փոխազդեցության նմանությունը պարզելու համար, ուսումնասիրվել են խմորասնկի, *Trypanosoma brucei* և ցեյտոսպեցիֆիկ էնոլազների փոխազդեցությունները խմորասնկի ՖԳՄ-ի հետ: Խմորասնկի էնոլազի և ՖԳՄ-ի մի շարք դիրքորոշումների փոխազդեցության արդյունքները օգնեցին բացահայտել ՖԳՄ-էնոլազ ֆունկցիոնալ կոմպլեքսի գոյությունը: Հետազոտվել է նաև այս ֆերմենտների միջև «մետաբոլիկ տեղափոխման» մեխանիզմի հնարավորությունը: Բացահայտվել են կոմպլեքսագոյացման համար պատասխանատու ամինաթթվային մնացորդները և քննարկվել է տարբեր էնոլազների ամինաթթվային մնացորդների տարբերությունների հնարավոր ֆունկցիոնալ հետևանքները:

105 30 23