

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ GLU35
В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ ЛИЗОЦИМА

Л.И.ИСМАИЛОВА

Бакинский Государственный Университет

Методом полужимирического конформационного анализа исследованы конформационные возможности каталитически активного остатка GLU35 в активном центре фермента лизоцима. Оценены конформационная подвижность этой аминокислоты и ее взаимодействия с участками активного центра фермента.

Ферменты - биологические катализаторы, управляющие реакциями клеточного метаболизма. Хорошо известно, что функции ферментов определяются их пространственным строением. Для понимания функционирования ферментов в настоящее время широко привлекаются теоретические методы исследования, в частности, метод теоретического конформационного анализа[1-3].

Целью данной работы является определение конформационных возможностей каталитически активного аминокислотного остатка Glu35 в активном центре фермента лизоцима. Лизоцим – один из наиболее хорошо изученных ферментов, его биологическая роль сводится к созданию барьера на пути возможного проникновения микробов в организм.

Лизоцим белка куриного яйца является глобулярным белком, состоящим из одной полипептидной цепи, включающей 129 аминокислотных остатков, скрепленной четырьмя дисульфидными связями. Благодаря гидролизу, осуществляемому лизоцимом, бактерии погибают. Разрушаемая ферментом оболочка трехмерная, сетчатая. Основными нитями этой бактериальной стенки служат цепочки из чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и N-ацетилмурамовой кислоты (MurNAc).

Согласно механизму, предложенному Филиппсом [4], расщепляемая связь $C_1 - O_1$ GlcNAc в положении D вступает в контакт с боковой цепью Glu35, что приводит к ее разрыву и образованию положительного иона C_1^+ . Как видно, каталитически активная аминокислота Glu35 имеет важное значение для действия фермента. Процесс ферментативного катализа связан с изменениями групп атомов в пространстве. Поэтому этот остаток был выбран для детального конформационного анализа.

На основе механической модели молекулы фермента лизоцима были рассмотрены потенциальные поверхности боковой цепи Glu35 в поле как фермента, так и его невалентного комплекса. Активный центр, выбранный согласно рентгеноструктурным данным [4], включал в себя 68 аминокислотных остатков, насчитывающих 947 атомов. Рис.1 демонстрирует расчетную модель активного центра лизоцима с подвижными боковыми цепями остатков Glu35 и Asp52.

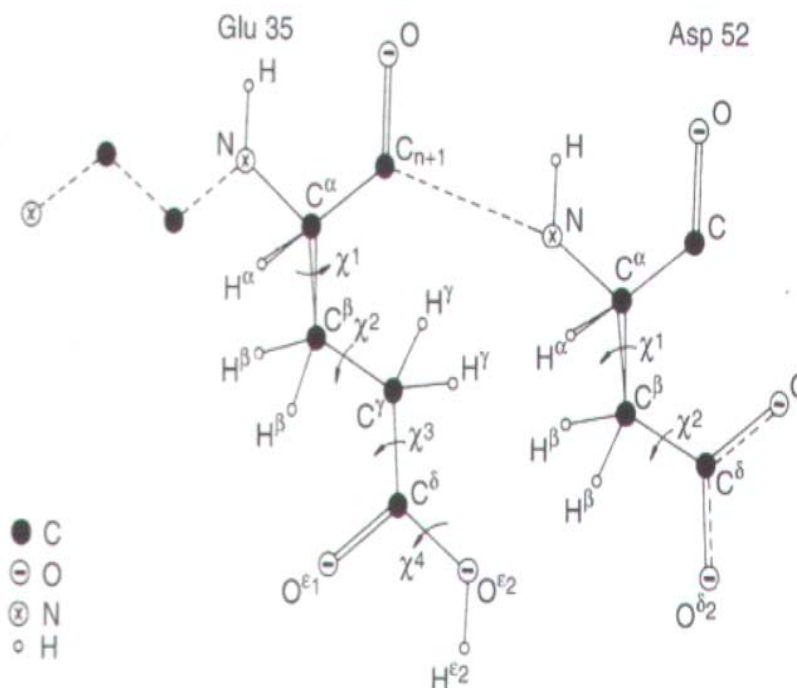


Рис. 1 Расчетная модель каталитически активных остатков Glu35 и Asp52

Здесь представлены конформационные параметры – 6 двугранных углов вращения боковых цепей каталитически активных остатков Glu35 и Asp52. Энергия системы определялась как сумма невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий с учетом образования водородных связей.

Остатки Glu35 и Asp52, согласно рентгеноструктурным данным, находятся довольно далеко друг от друга. Оценка расстояния между атомами C^δ (Glu35) и C^γ (Asp52) составляет 7,3 Å (рис 1). Поэтому, когда находились конформационные возможности боковой цепи Glu35, углы боковой цепи Asp52 фиксировались в соответствии с этими координатами. Для остатка Glu35 экспериментальные углы составляют: $\chi_1 = -148^\circ$, $\chi_2 = 37^\circ$, $\chi_3 = -75^\circ$.

На первом этапе были исследованы конформационные возможности боковой цепи остатка Glu35. Были построены карты потенциальной поверхности, позволяющие оценить конформационные возможности боковой цепи этого остатка в активном центре фермента. Анализ конформационных карт показывает, что самой жесткой является энергетическая карта, отвечающая углу $\chi_1 = 180^\circ$. Здесь практически допустима только одна конформация, отвечающая углам $\chi_1 = 180^\circ$, $\chi_2 = 60^\circ$, $\chi_3 = 90^\circ$. По двугранному углу χ_3 , возможны два значения $\chi_3 = 90^\circ$ и $\chi_3 = -90^\circ$. Сечение потенциальной поверхности конформационной карты $\chi_2 - \chi_3$ аминокислоты Glu35 в активном центре лизоцима, соответствующей положению двугранного угла $\chi_1 = 60^\circ$, показывает, что самое низкоэнергетическое значе-

ние углов на этой конформационной карте отвечает значениям $\chi_2 = -90^\circ$, $\chi_3 = 90^\circ$.

Рис. 2 представляет конформационную карту аминокислотного остатка Glu35 в активном центре фермента при $\chi_1 = -60^\circ$. Как видно, при изменении двугранного угла χ_2 в области от 60 до 120° имеется некоторая свобода вращения по углу χ_3 . Самой низкоэнергетической является конформация с углами $\chi_1 = -60^\circ$, $\chi_2 = 60^\circ$, $\chi_3 = 60^\circ$. Что касается угла χ_3 , то для него можно выделить два конформационных низкоэнергетических состояния $\chi_3 = 60^\circ$ и $\chi_3 = -150^\circ$. Если сравнить все три возможных значения угла χ_1 , то самым низкоэнергетическим является его положение $\chi_1 = -60^\circ$, в этой же конформации подвижность боковой цепи остатка Glu35 в активном центре фермента больше.

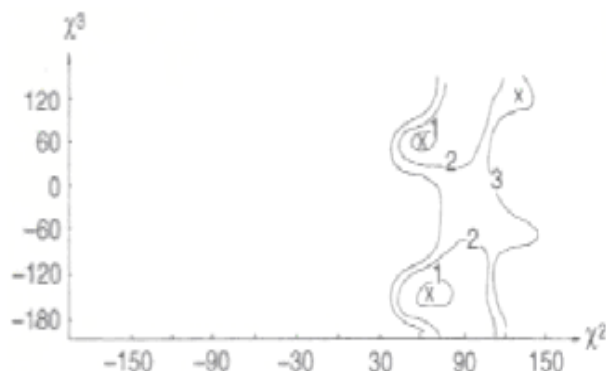


Рис. 2 Конформационная энергетическая карта углов χ_2 - χ_3 ($\chi_1 = -60^\circ$) остатка Glu35

Далее мы оценили расположение боковой цепи Glu35 с остатками активного центра лизоцима, который был разбит на 6 участков: I (Tyr20-Tyr23); II (Trp28); III (Phe34-Asn37); IV (Thr40-Cys64); V (Arg68-Leu75); VI (Ile98-Cys115). Расчеты обнаружили взаимодействия боковой цепи Glu35 с участками III, IV и VI, которые в третичной структуре фермента оказываются сближенными с ним. Было найдено, что в свободном ферменте боковая цепь Glu35 может иметь пять положений. Эти конформации были проминимизированы, причем при минимизации энергии допускалась свобода вращения обеих боковых цепей остатков Glu35 и Asp52. В табл.1 приведены двугранные углы боковой цепи аминокислотного остатка Glu35 его конформаций в активном центре лизоцима.

Таблица 1

Геометрические(град) и энергетические(ккал/моль) параметры стабильных конформаций боковой цепи Glu35

№	Углы Glu35(град)				U _{отн}
	χ_1	χ_2	χ_3	χ_4	
1	-66	66	58	180	0.0
2	-72	149	122	178	1.8
3	-68	-179	55	180	1.9
4	-17	-76	108	179	4.9
5	-160	45	91	178	4.8

№	Взаимодействие с ферментом			Энергия подвижной части				U _{отн}
	U _н	U _{эл}	U	U _{лв}	U _{эл}	U _г	U	
1	-15.0	-6.8	-21.7	-2.4	-1.6	0.4	-3.5	0.0
2	-15.3	-6.4	-21.7	-2.2	-1.6	2.0	-1.8	1.8
3	-13.2	-6.6	-19.8	-2.4	-1.6	0.4	-3.6	1.9
4	-12.7	-6.8	-19.5	-2.3	-1.5	2.9	-0.9	4.9
5	-10.2	-6.6	-16.7	-2.4	-1.4	1.1	-2.7	4.8

Предпочтительность той или иной ориентации боковой цепи аминокислоты Glu35 определяется ее взаимодействиями с участками III, IV и VI (табл. 2), которые в третичной структуре фермента расположены наиболее близко к этому остатку. Из табл. 2 видно, что дестабилизация пятой конформации вызвана возрастанием энергии взаимодействия с IV участком, включающим фрагмент Thr40 – Cys64 лизоцима. Именно в этой конформации оцененное нами расстояние между атомом C^δ Glu35 и C₁⁺ сахарного кольца в положении D субстрата составляет 4.4 Å, а во всех остальных конформациях, энергия которых меньше, это расстояние составляет свыше 7Å.

Таблица 2

Энергия взаимодействия (ккал/моль) боковой цепи Glu35

№	Взаимодействия с участками фермента						Glu35 Уккал/моль
	I	II	III	IV	V	VI	
1	0.1	-0.2	-3.6	-2.0	0.2	-2.5	-3.8
2	0.1	-0.2	-2.4	-2.9	0.2	-2.8	-3.6
3	0.1	-0.2	-2.1	-3.1	0.2	-1.0	-3.8
4	0.1	-0.1	-0.7	-2.1	0.2	-3.0	-3.7
5	0.1	0.0	-1.6	2.6	0.2	-2.9	-3.7

Можно сказать, что расчет подтверждает экспериментально наблюдаемые конформационные изменения, вызванные комплексообразованием. Таким образом, в свободном ферменте активная конформация проигрывает свыше 4 ккал/моль и является одной из низкоэнергетических конформаций, но не самой предпочтительной из них. Расчет подтверждает экспериментально наблюдаемые конформационные изменения, вызванные комплексообразованием. Активация Glu35 может происходить за счет энергии фермент-субстратного взаимодействия.

Далее нами исследовались невалентные комплексы лизоцима с моно, ди- и тетрасахаридами. Расчет обнаружил лишь одну конформацию для тетрасахаридного участка, при этом значения двугранных углов при гликозидных связях составляли: у кольца А-В ($\varphi_g=43^\circ$ и $\psi_g=-10^\circ$), В-С ($\varphi_g=46^\circ$ и $\psi_g=-11^\circ$), С-Д ($\varphi_g=50^\circ$ и $\psi_g=-14^\circ$). В этой низкоэнергетической структуре двугранные углы боковых привесков сахарных колец составляли: для А ($Q_g^5=63^\circ$, $Q_g^6=180^\circ$, $Q_g^2=-32^\circ$), В ($Q_g^5=180^\circ$, $Q_g^6=180^\circ$, $Q_g^2=-30^\circ$), С ($Q_g^5=65^\circ$, $Q_g^6=180^\circ$, $Q_g^2=-31^\circ$), Д ($Q_g^5=180^\circ$, $Q_g^6=180^\circ$, $Q_g^2=-30^\circ$). Для боковой цепи каталитически активного остатка Glu35 лизоцима двугранные углы составляли: $\chi^1=-145^\circ$, $\chi^2=98^\circ$, $\chi^3=-120^\circ$. Для этого значения двугранного угла χ^1 была построена конформационная карта углов χ^2 - χ^3 уже в поле комплекса фермента лизоцима с тетрасахаридом (GlcNAc-GlcNAc)₂, конформационная карта представлена на рис.3.

Из нее видно, что боковая цепь Glu35 сохраняет незначительную конформационную свободу по углу χ^2 . Вероятно, эта конформационная подвижность нужна для обеспечения возможности взаимодействия протона боковой цепи Glu35 с атомом кислорода сахарного кольца в положении D.

В случае экспериментального значения двугранного угла $\chi_1 = -148^\circ$, конформационная карта демонстрирует, что подвижность боковой цепи остатка Glu35 ограничена небольшой областью с минимумом при $\chi_2 = 90^\circ$, $\chi_3 = -130^\circ$. Оценка расстояния между атомом C^δ Glu35 и C_1^+ сахарного кольца в положении D субстрата примерно 4.4 Å. Это расстояние может уменьшиться, а атомы C^δ и C_1^+ сблизиться, если уменьшится угол χ_2 Glu35. Такие конформационные перестройки возможны, как показывают построенные энергетические карты. Можно предположить, что именно связывание субстрата и приводит к изменению конформации боковой цепи каталитически активного остатка Glu35.

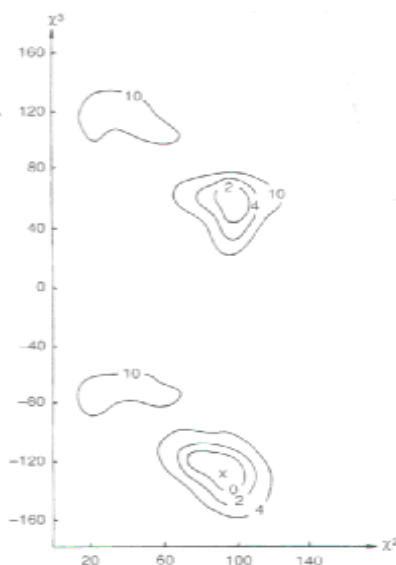


Рис. 3. Конформационная энергетическая карта углов χ_2 - χ_3 ($\chi_1 = -145^\circ$, $\chi_2 = 98^\circ$) остатка Glu35

Полученные результаты показали, что изменение положения Glu 35 необходимо для атаки на расщепляемую связь, происходит после образования комплекса. Найдено, что каталитически активные остатки обладают конформационной свободой и готовы к определенным конформационным изменениям, необходимым для химических взаимодействий. Невалентные фермент-ингибиторные взаимодействия не приводят ни в молекуле ингибитора, ни в молекуле фермента к возникновению деформаций и напряжений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Godjaev N., Akyuz S., Ismailova L. ARI, Istanbul, 1998, V.51, P. 56-60
2. Попов Е.М., Кашпаров И.В., Румш Л.Д., Попов М.Е. Биоорганическая химия, 1999, Т.25, С.418-422

3. Попов Е.М., Кашпаров И.В., Румш Л.Д., Попов М.Е. Биорган. химия, 1999, Т.25, С.423-435
4. Imoto T., Johnson L., North A., Phillips D. In the Enzymes (Boyer P. ed) 1972, V.7, P.666-868

**LİZOSİMİNİN FƏAL MƏRKƏZİNDƏ
GLU35-in KONFORMASIYA DİNAMİKASI**

L.İ.İSMAYILOVA

XÜLASƏ

Nəzəri konformasiya analizi üsulu ilə lizosim fermentinin fəal mərkəzində katalitik fəal Glu 35 aminturşu qalığının konformasiya imkanları öyrənilmişdir. Bu aminturşu qalığının konformasiya mütəhərriqliyi və fermentin fəal mərkəzi ilə qarşılıqlı təsiri müəyyən edilmişdir.

**CONFORMATIONAL DYNAMICS OF GLU35 OF
LYSOZYME ACTIVE CENTER**

L.I.ISMAILOVA

SUMMARY

The conformational possibilities of the GLU35 of lysozyme active center were investigated using a method of the theoretical conformational analysis. A conformational dynamics of this amino acid residues and intermolecular interactions were estimated.