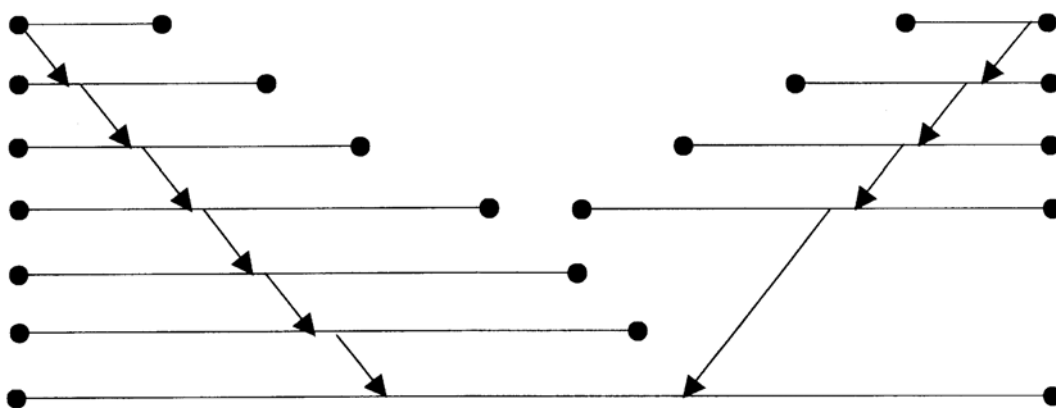




## МЕТОД РАСЧЕТА

Моделирование структуры фрагмента проводилось методами молекулярной механики с помощью пакета прикладных компьютерных программ, основанных на количественных расчетах полной конформационной энергии исследуемого фрагмента и поисках ее локальных минимумов. Конформационная энергия ( $E_{\text{конф}}$ ) представляется в виде аддитивной суммы вкладов от невалентных ( $E_{\text{нев}}$ ), электростатических ( $E_{\text{эл}}$ ) и торсионных взаимодействий ( $E_{\text{торс}}$ ) атомов и энергии образования водородных связей ( $E_{\text{в.с.}}$ ). Используемые в работе полуэмпирические потенциальные функции и их параметризация взяты из работ [12,13]. Минимизация энергии проводилась методом сопряженных градиентов по программе, описанной в [14]. Моделирование неполярного окружения атомов в вычислительном эксперименте осуществлялось с помощью величины  $\epsilon=4$  и параметра  $D$ , описывающего глубину водородной связи, равную 4 ккал/моль в потенциале Морзе [12]. Расчеты проводились на основе поэтапного подхода, предложенного в работе [15], путем нахождения низкоэнергетических конформационных состояний отдельных пептидных звеньев согласно схеме (Рис.2).

**Met<sup>30</sup>-Ser<sup>31</sup>-Pro<sup>32</sup>-Arg<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Ile<sup>35</sup>-Gly<sup>36</sup>-Arg<sup>37</sup>-Arg<sup>38</sup>-Gln<sup>39</sup>-Ser<sup>40</sup>**



**Рис.2.**

Схема расчета фрагмента Met<sup>30</sup>-Ser<sup>40</sup> чТГ1.

В работе использована стандартная система идентификаторов, описывающая конформационные состояния как отдельных аминокислотных остатков (R, B, L и P), так и фрагментов различной длины. Форма аминокислотного остатка характеризует принадлежность углов  $\varphi$  и  $\psi$  его пептидной цепи к той или иной области конформационного пространства: R ( $\varphi, \psi = -180 \div 0^\circ$ ), B ( $\varphi = -180 \div 0^\circ$ ,  $\psi = 0 \div 180^\circ$ ) L ( $\varphi, \psi = -0 \div 180^\circ$ ), P ( $\varphi = 0 \div 180^\circ$ ,  $\psi = -180 \div 0^\circ$ ). Сочетание форм аминокислотных остатков в полипептидной цепи в пространстве независимых координат  $x, y, z$  описывается шейпами двух типов: *e* и *f*. Они характеризуют развернутый и свернутый типы структуры полипептидной цепи соответственно. Структурные типы различаются углом  $\theta = \psi_i + \varphi_{i+1}$ , значение которого при всех возможных формах остатков близко к нулю в шейпе *e* или равно  $180^\circ$  в шейпе *f*. Конформационные состояния боковой цепи аминокислотных остатков обозначаются символом  $\chi_i$ , где  $i=1, 2, 3$  для значений угла  $\chi$  в интервале  $0 \div 120^\circ$ ;  $-120 \div 120^\circ$  и  $-120 \div 0^\circ$  соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Фрагмент Met<sup>30</sup>-Ser<sup>40</sup> регуляторного домена чТГ1 может реализовывать в свободном состоянии 60 низкоэнергетических конформационных состояний, которые удовлетворяют энергетическому критерию  $E_{отн} = E_{конф} - E_{мин} \leq 5$  ккал/моль (Таблица 1 и 2). Все они принадлежат восьми структурным типам основной цепи и содержат реверсивные повороты на коротких тетрапептидных участках Pro<sup>32</sup>-Phe<sup>35</sup> и Phe<sup>34</sup>-Arg<sup>37</sup> (Таблица 3). Возможность реализации нескольких близких по энергии, но существенно различных конформационных состояний изолированного фрагмента Met<sup>30</sup>-Ser<sup>40</sup> обусловлена отсутствием влияния поля белка и специфических межмолекулярных взаимодействий с окружающей средой. Предпочтительные конформации стабилизированы взаимодействиями разной природы и, следовательно, различным образом будут реагировать на внешние условия. Однако, очевидно, что индуцированные средой перестройки могут происходить путем смещения конформационного равновесия к одному из допустимых структурных вариантов фрагмента без существенных затрат энергии.

**Таблица 1.**

Распределение низкоэнергетических конформаций фрагмента Met<sup>30</sup>-Ser<sup>40</sup> чТГ1 по структурным типам пептидной цепи.

№	шейп	Интервал относительной энергии, ккал/моль			
		0-1	1-2	2-3	3-4
1.	eefeffeef	2	4	2	2
2.	eefffeefef	-	-	-	1
3.	eefffeffef	1	4	3	4
4.	eefffefeef	-	3	7	8
5.	eefffeeeefe	-	5	2	5
6.	eefffeeeef	-	-	1	1
7.	eeffffeeef	-	-	-	1
8.	feffffefe	-	-	-	5

**Таблица 2.**

Низкоэнергетические конформации фрагмента Met<sup>30</sup>-Ser<sup>40</sup> чТГ1.

№	шейп	Энергетические вклады, ккал/моль					
		Конформация	$E_{конф}$	$E_{нев}^*$	$E_{эл}$	$E_{торс}$	$E_{отн}$
1.	eefeffeef	B <sub>2</sub> B <sub>1</sub> RB <sub>2</sub> R <sub>1</sub> B <sub>3</sub> PB <sub>1</sub> B <sub>2</sub> R <sub>333</sub> R <sub>1</sub>	-33.6	-57.0	18.8	4.6	0.0
2.	eefffeefef	B <sub>2</sub> B <sub>3</sub> RR <sub>2</sub> R <sub>3</sub> B <sub>2</sub> LR <sub>3</sub> B <sub>2</sub> R <sub>311</sub> R <sub>1</sub>	-32.7	-53.3	16.3	4.2	0.9
3.	eefffeffef	B <sub>2</sub> B <sub>1</sub> RR <sub>3</sub> R <sub>2</sub> B <sub>2</sub> RR <sub>3</sub> B <sub>2</sub> R <sub>331</sub> R <sub>1</sub>	-32.5	-52.5	16.5	3.4	1.1
4.	eefffefeef	B <sub>2</sub> B <sub>3</sub> RR <sub>2</sub> R <sub>3</sub> B <sub>2</sub> RB <sub>1</sub> B <sub>2</sub> R <sub>321</sub> B <sub>1</sub>	-32.3	-52.0	15.9	3.7	1.3
5.	eefffeeeefe	B <sub>2</sub> B <sub>3</sub> RR <sub>2</sub> R <sub>3</sub> B <sub>2</sub> BB <sub>1</sub> R <sub>2</sub> B <sub>121</sub> R <sub>1</sub>	-31.3	-52.2	16.9	4.0	2.4
6.	eefffeeeef	B <sub>2</sub> B <sub>3</sub> RR <sub>2</sub> R <sub>3</sub> B <sub>2</sub> LB <sub>1</sub> B <sub>2</sub> R <sub>321</sub> B <sub>1</sub>	-30.4	-50.3	16.4	3.5	3.3
7.	eeffffeeef	B <sub>3</sub> B <sub>3</sub> RR <sub>2</sub> L <sub>1</sub> B <sub>3</sub> LB <sub>1</sub> B <sub>2</sub> R <sub>321</sub> B <sub>1</sub>	-29.9	-51.2	17.4	4.0	3.8
8.	feffffefe	R <sub>3</sub> B <sub>3</sub> RR <sub>2</sub> R <sub>3</sub> B <sub>2</sub> PB <sub>1</sub> R <sub>2</sub> B <sub>121</sub> R <sub>1</sub>	-29.6	-54.6	20.5	4.6	4.0

\*Примечание: Энергия водородных связей включена в  $E_{нев}$ .

Проанализируем конформационные состояния отдельных аминокислотных остатков в структуре исследуемого фрагмента. Вклад от энергии межостаточных взаимодействий Met<sup>30</sup> с соседними и удаленными по цепи остатками варьирует в пределах от -10 до -17 ккал/моль (Рис.3). Met<sup>30</sup> предпочтительно реализует В-формы основной цепи и благодаря значению угла  $\chi_1 = -60^\circ$  ( $C^\alpha-C^\beta$ ) участвует в стабилизирующих структуру всего фрагмента невалентных взаимодействиях с боковой цепью Phe<sup>34</sup> (~-4 ккал/моль). В конформации 8 (Таблица 2), содержащей свернутый участок полипептидной цепи Pro<sup>32</sup>-Arg<sup>38</sup>, боковая цепь Met<sup>30</sup> участвует также в дисперсионных взаимодействиях с Gln<sup>39</sup>. Таким образом, несмотря на изоэнергетичность R- и В-форм основной цепи Met<sup>30</sup>, в глобальной конформации он образует большое число стабилизирующих структуру фрагмента Met<sup>30</sup>-Ser<sup>40</sup> контактов как с ближайшими, так и с удаленными по цепи остатками (Рис.3).

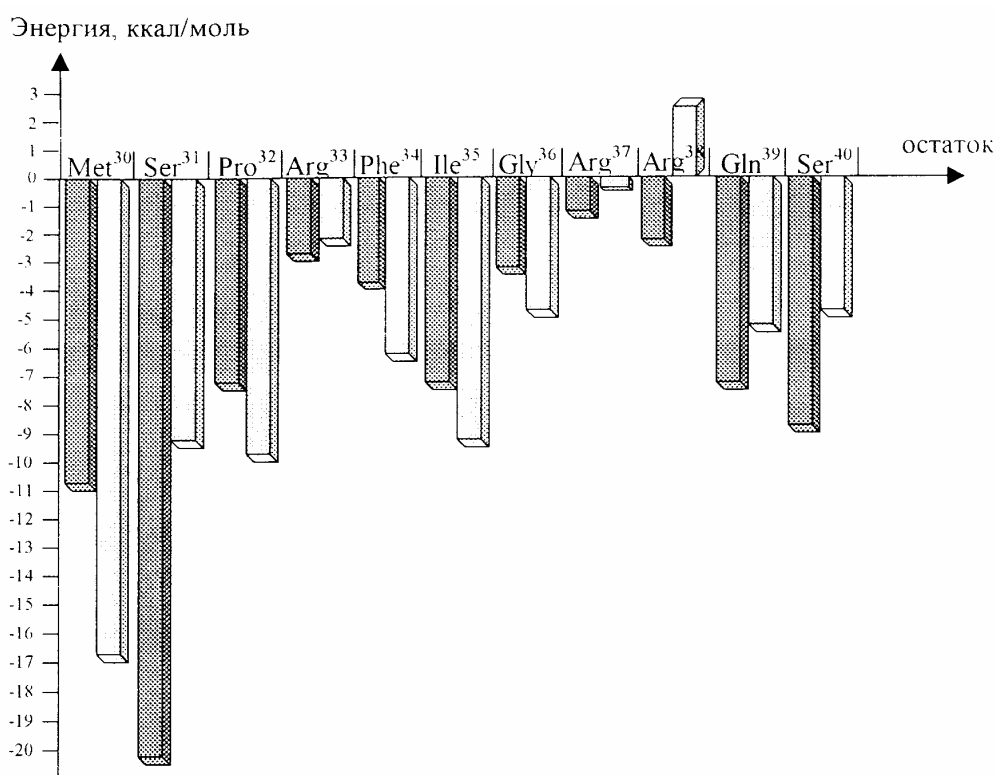


Рис.3.

Вклад энергии межостаточных взаимодействий в конформации фрагмента Met<sup>30</sup>-Ser<sup>40</sup> с :

- E<sub>отн.</sub> = 0,0 ккал/моль
- E<sub>отн.</sub> = 4,0 ккал/моль

Остатки серина в положениях 31 и 40 N-концевого регуляторного домена чТГ1 играют важную роль в функционировании фермента. Согласно исследованиям последних лет, Ser<sup>40</sup> одновременно фосфорилируется АМР-зависимой протеинкиназой (ПКА) и кальмодулин-зависимой ПКА II [16]. Установлено, что фосфорилирование Ser<sup>40</sup> увеличивает скорость диссоциации дофамина в несколько сот раз, а связывание дофамина уменьшает скорость фосфорилирования Ser<sup>40</sup> посредством ПКА [17]. Установлено, что активация чТГ1 посредством фосфорилирования Ser<sup>40</sup> связана с изменением конформации фрагмента [18]. В данной работе на основе исследования зависимости конформационной энергии фрагмента от значений двугранных углов основной и боковых цепей Ser<sup>31</sup> и Ser<sup>40</sup> установлены их энергетически выгодные состояния в пространственной структуре N-концевого домена. Согласно результатам расчета, положение Ser<sup>31</sup> строго фиксировано и в

глобальной конформации описывается значениями углов  $\phi$  и  $\psi$ , равными  $-95$  и  $154^\circ$ , соответственно (Таблица 3). Боковая и основная цепи  $\text{Ser}^{31}$  образуют водородную связь, которая характерна для структуры большинства известных белков. Как следует из Рис. 3, суммарный вклад от энергии межостаточных взаимодействий  $\text{Ser}^{31}$  максимален и варьирует в пределах от  $-10$  до  $-20$  ккал/моль. Энергетически выгодные контакты характерны для  $\text{Ser}^{31}$  и  $\text{Arg}^{33}$ ,  $\text{Phe}^{35}$  ( $-3$  и  $-5$  ккал/моль, соответственно). Т.о., полученные результаты свидетельствуют, что  $\text{Ser}^{31}$  плотно упакован в структуре регуляторного домена, а конформационная подвижность его боковой цепи ограничена, так как затраты на изменение положения ОН- группы составляет  $-2$  ккал/моль.

**Таблица 3.**

Значения двугранных углов (град) в низкоэнергетических конформациях фрагмента  $\text{Met}^{30}$ - $\text{Ser}^{40}$  чТГ1, содержащих  $\beta$ -поворот на участках  $\text{Pro}^{32}$ -  $\text{Phe}^{35}$  и  $\text{Phe}^{34}$ - $\text{Arg}^{37}$ .

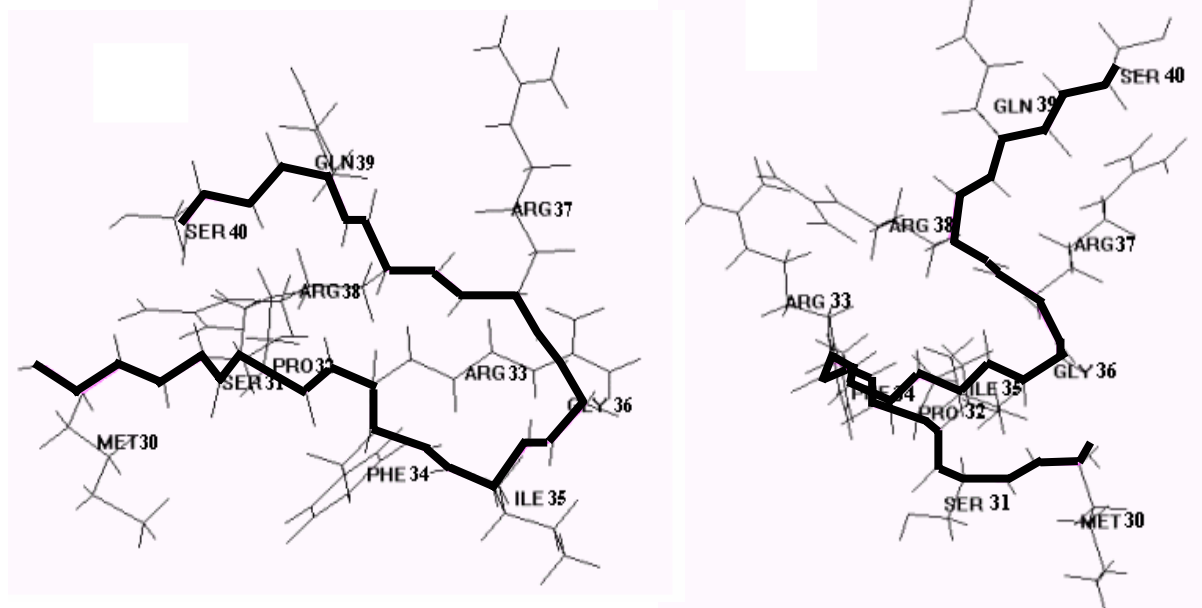
Аминокислотный остаток	Конформация	
	$B_2B_1RB_2R_1B_3PB_1B_2R_{333}R_3$	$R_3B_3RR_2R_3B_2PB_1R_2B_{121}R_1$
$\text{Met}^{30}$	-125, 144, 181, 182, 174, 178, 180	-102, -55, 176, -64, 181, 180, 180
$\text{Ser}^{31}$	-95, 154, 171, 58, 176	-133, 68, 181, -64, 180
$\text{Pro}^{32}$	-46, 174	-63, 182
$\text{Arg}^{33}$	-118, 110, 174, 182, 178, 179, 179	-105, -53, 173, 195, 179, 181, 180
$\text{Phe}^{34}$	-103, -20, 176, 59, 89	-133, -62, 178, -67, 103
$\text{Phe}^{35}$	-71, 116, 182, -58, 184, 178, 184	-155, 140, 177, 180, 183, 177, 183
$\text{Gly}^{36}$	96, -88, 183	90, -89, 179
$\text{Arg}^{37}$	-118, 153, 182, 61, 180, 180, 180	-147, 171, 178, 66, 177, 181, 180
$\text{Arg}^{38}$	-116, 120, 181, 179, 181, 180, 181	-88, -51, 179, 184, 179, 179
$\text{Gln}^{39}$	-93, -54, 181, 59, 65, -83	-156, 170, 176, 64, 179, 101
$\text{Ser}^{40}$	-96, 101, 180, 60, 180	-81, -43, 180, 56, 179
$E_{\text{отн}}$ , кал/моль	0,0	4,0
Водородные связи	$\text{Pro}^{32} \text{C}'=\text{O} \dots \text{H}-\text{N} \text{Phe}^{35}$ $\text{Arg}^{33} \text{N}^\epsilon -\text{H} \dots \text{O}=\text{C}' \text{Phe}^{35}$	$\text{Met}^{30} \text{C}'=\text{O} \dots \text{H}-\text{N} \text{Gly}^{36}$ $\text{Phe}^{34} \text{C}'=\text{O} \dots \text{H}-\text{N} \text{Arg}^{37}$

\*Примечание. Величины двугранных углов даны в последовательности:  $\phi, \psi, \omega, \chi_1, \chi_2, \dots$  (для  $\text{Pro} \psi, \omega$ ).

В отличие от  $\text{Ser}^{31}$ , остаток  $\text{Ser}^{40}$  может реализовывать конформации, принадлежащие как R-, так и B-областям конформационного пространства. Изучение подвижности его гидроксильной группы показало, что затраты на изменение двугранного угла  $\chi_1$  в широких пределах от  $-180$  до  $180^\circ$  не превышают  $0,5$  ккал/моль, т.е. ориентация ОН-группы не определяется стерическими условиями ближайшего окружения.  $\text{Pro}^{32}$ , в отличие от других остатков, благодаря жестко фиксированной связи  $\text{N}-\text{C}^\alpha$  не может реализовывать L-состояние. Предпочтительными для него являются лишь состояния, в которых угол  $\psi$  принимает только отрицательные значения, соответствующие R-области конформационного пространства (Таблица 2). В 80% низкоэнергетических структур, полученных для фрагмента  $\text{Met}^{30}$ - $\text{Ser}^{40}$ , остаток  $\text{Pro}^{32}$  участвует в формировании реверсивного  $\beta$ -поворота на участке  $\text{Pro}^{32}$ -  $\text{Phe}^{35}$ . Об этом свидетельствуют расстояния между  $\text{C}^\alpha$ -атомами  $\text{Pro}^{32}$ -  $\text{Phe}^{35}$ ,  $\leq 7 \text{ \AA}$ , и водородная связь между атомом кислорода карбоксильной группы  $\text{Pro}^{32}$  и NH-группой основной цепи  $\text{Phe}^{35}$ .

Важную роль в формировании пространственной структуры исследуемого фрагмента играют остатки аргинина в положениях 33, 37 и 38 (Рис.1). Благодаря наличию положительно заряженной боковой цепи Arg<sup>33</sup>, Arg<sup>37</sup> и Arg<sup>38</sup> участвуют как в дисперсионных, так и в электростатических взаимодействиях с соседними и удаленными по цепи остатками. Согласно результатам расчета, Arg<sup>33</sup> располагается в вершине свернутых участков Pro<sup>32</sup>-Phe<sup>35</sup> и ориентирован в окружающую среду. Значение угла  $\chi_1$  его боковой цепи, равное 180°, встречается во всех типах полученных структур, за исключением конформации 3 (Таблица2), в которой допускается образование водородной связи между атомом Н<sup>6</sup> гуанидиновой группы Arg<sup>33</sup> с основной цепью Phe<sup>35</sup> на расстоянии 1,8 Å.

В отличие от Arg<sup>33</sup>, два других остатка аргинина плотно упакованы в структуре исследуемого фрагмента. В глобальной конформации они реализуют В-формы основной цепи, а их боковые цепи с равной вероятностью могут принимать низкоэнергетические положения при  $\chi_1=60^\circ$  и  $-60^\circ$ . Как следует из Рис.4, боковые цепи этих остатков располагаются внутри свернутых структур и, несмотря на относительно небольшую суммарную величину энергии межостаточных взаимодействий, ограничены в отношении подвижности углов  $\phi$  и  $\psi$ , т.е. положения Arg<sup>37</sup> и Arg<sup>38</sup> определяются в основном стерическими условиями окружения уже на фрагменте Met<sup>30</sup>-Ser<sup>40</sup> регуляторного домена. Полученные результаты позволяют предположить, что Arg<sup>37</sup> и Arg<sup>38</sup> играют существенную роль в формировании пространственной структуры регуляторного домена чТГ1, и любые модификации на этом участке могут привести к глобальным перестройкам в конформационном состоянии N-концевого регуляторного домена чТГ1, что согласуется с данными работ [10, 11].



**Рис.4.**

Низкоэнергетические конформации фрагмента Met<sup>30</sup>-Ser<sup>40</sup> чТГ1, содержащие  $\beta$ -поворот на участках Pro<sup>32</sup>-Phe<sup>35</sup> и Phe<sup>34</sup>-Arg<sup>37</sup>.

Наиболее подвижными в структуре фрагмента Met<sup>30</sup>-Ser<sup>40</sup> являются остатки Phe<sup>34</sup>, Ile<sup>35</sup> и Gly<sup>36</sup>. Несмотря на то, что углы  $\phi$  и  $\psi$  основной цепи Phe<sup>34</sup> принимают только отрицательные значения, его боковая цепь свернута к остову полипептидной цепи, и значения угла  $\chi_1=180^\circ$  запрещены в 87% рассчитанных структур. Gly<sup>36</sup> может находиться в R, B, L и P-областях конформационного пространства, т.е. сохраняет свойство «шарнирного» остатка, характерное для большинства известных белков.

Т.о., обобщая результаты исследований, можно предположить, что фрагмент Met<sup>30</sup>-Ser<sup>40</sup> N-концевого регуляторного домена чТГ1 в свободном состоянии содержит два участка, структура которых соответствует реверсивному повороту полипептидной цепи в пространстве. В результате исследуемый фрагмент образует свернутую структуру, стабилизированную межостаточными взаимодействиями не только между соседними, но и удаленными по цепи остатками.

1. T. Nagatsu, M.Levitt, S.Udenfriend, J.Biol.Chem., **239** (1964) 2910.
2. A.L.Lehninger, Principles of Biochemistry, The John Hopkins University School of Medicine, Worth Publishers, Inc., (1982).
3. K.E.Vrana, S.J.Walker, P.Rucker, X.Liu, J.Neurochem., **63(60)** (1994) 2014.
4. K.E.Goodwill, C.Sabatier, R.C.Stevens, Biochemistry, **39** (1988) 13437.
5. J.Mallet et al, Nature, **326(6114)** (1987) 707.
6. J.Haavik, K. Toska, Neurobiol., **16(3)** (1998) 285.
7. E.Iseki, M.Kato, W.Mauri, K.Ulda, K.Kiosaka, J.Neurol. Sci., **185(2)** (2001) 129.
8. F.E.Bloom, A.Lazerson, L.Hofstadter, Brain, mind, behavior, Educ. Broadcasting Corporation, (1985) 218.
9. Д.Р.Лоуренс, П.Н.Бенитт, Клиническая фармакология: в 2 т., т.2 – М., «Медицина», (1991) 386.
10. A.Nakashima, N.Hayashi, K.Mori, Y.S.Kaneko, T.Nagatsu, A.Ota, FEBS Lett., **465** (2000) 59.
11. A.Nakashima, Y.S.Kaneko, K.Mori, K.Fujiwara, T.Tsugu, T.Suzuki, T.Nagatsu, A.Ota, J.Neurochem., **82(1)** (2002) 202.
12. F.A.Momany, R.F.McGuire, A.W.Burgess, H.A.Scheraga, J. Phys. Chem., **79** (1975) 2361.
13. IUPAC-IUB Quantity, Units and Symbols in Physical Chemistry, v.39, Blackwell Scientific Publications, Oxford, (1988).
14. И.С.Максумов, Л.И.Исмаилова, Н.М.Годжаев, Журн. структ. Химии, **24** №4 (1983) 147.
15. E.M. Popov, Int. J. Quant. Chem., **16** (1979) 707.
16. Le Bourdelles, P.Horellou, J.P.Le Caer, P.Denefle, M.Latta, J.Haavik, B.Guinbert, J.F.Mayaux, J.Mallet, J. Biol.Chem., **266(26)** (1991) 17124.
17. I.Ruth, R.McCulloch, P.Fitzpatrick, Archives of Biochem. and Biophys., **367(1)** (1999) 143.
18. A.Martinez, J.Haavik, T.Flatmark, J.L.Arrondo, A.Muga, J. Biol. Chem., **271** (1996) 19737.

#### TIROZINHİDROKSİLAZA TƏNZİMLƏYİCİ DOMENİNİN AKTİV FRAQMENTİNİN KONFORMASİYALARI

**N.N.MUSTAFAYEVA, İ.N.ƏLİYEVA, C.İ.ƏLİYEV**

Katekolaminlərin sintez və əksinhibirləşmə mexanizminə məsuliyyətli olan insanın 1 tipli tirozinhidroksilazanın Met<sup>30</sup>-Ser<sup>40</sup> N-sonuncu tənzimləyici domenin fraqmentinin vəziyyəti öyrənilmişdir. Ayırı-ayrı amin turşu qalıqlarının konformasiya müstəhərrikliliyi öyrənilmiş və fraqmentinin fəza quruluşunun formalaşmasında onların rolu müəyyənləşdirilmişdir.

#### CONFORMATIONS OF THE ACTIVE SEGMENT OF THE REGULATORY DOMAIN OF THE TYROSINE HYDROXYLASE

**N.N.MUSTAFAYEVA, İ.N.ALİEVA, D.İ.ALİEV**

The low-energy conformations of the Met<sup>30</sup>-Ser<sup>40</sup> segment of the regulatory domain of the human tyrosine hydroxylase type 1, which plays the key role in the processes of catecholamines synthesis and feedback inhibition mechanism, have been established by the method of molecular mechanics. The amino acids conformational flexibility and their role at the formation of the spatial organization of enzyme active segment have been revealed.

Редактор: А.Гарибов