

МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЛУТАМИНСИНТЕТАЗЫ *Escherichia coli* ИОНАМИ МАГНИЯ

© 2018 г. Н.В. Казмирук, С.Е. Бороновский, Я.Р. Нарциссов

НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, 115404, Москва, ул. 6-ая Радиальная, 24/14

E-mail: kazmiruk@icmph.ru

Поступила в редакцию 24.07.17 г.

После доработки 02.02.18 г.

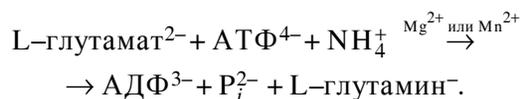
Проведено компьютерное моделирование работы глутаминсинтетазы, ключевого фермента в метаболизме азота, катализирующего АТФ-зависимую реакцию образования глутамина из комплекса глутамата и аммония, с использованием стохастического метода, в основе которого лежит вероятностный подход, позволяющий имитировать процессы субстратного связывания и активации. Оценено влияние ионов свободного Mg^{2+} на работу глутаминсинтетазы и определен оптимальный активационный механизм. Показано, что в условиях *in vivo* активация бактериальной глутаминсинтетазы происходит за счет последовательного связывания ионов Mg^{2+} со свободной формой фермента.

Ключевые слова: глутаминсинтетаза, стохастическое моделирование, магний, регуляция активности, *E. coli*.

Глутаминсинтетаза (GS) (EC 6.3.1.2) является важным ферментом, играющим ключевую роль в метаболизме глутаминовой кислоты. Данный белок катализирует синтез глутамина, который вовлечен в регуляцию уровня аммония в клетке [1], являясь донором аминогруппы для большинства других аминокислот, а также задействован в синтезе различных соединений и сопряжен с реакциями цикла Кребса [2].

GS найдена во всех организмах, начиная от простейших одноклеточных и заканчивая высшими позвоночными. Существует три основные формы фермента: GSI, найденная в основном в прокариотах [3], GSII, в большинстве представленная в эукариотах [4], но частично и в прокариотах, и наконец GSIII, наименее изученная форма, найденная только в прокариотах [5]. Данные формы имеют некоторые различия в аминокислотной последовательности и в четвертичной структуре, однако общеизвестно, что активный центр GS является консервативным [6–10].

Глутаминсинтетаза из *E. coli* катализирует реакцию биосинтеза глутамина [6], для осуществления которой требуется два двухвалентных иона магния или марганца на один активный сайт:



Активность бактериальной формы фермента регулируется гибкой системой кумулятивно-го ингибирования по принципу обратной связи, где в качестве ингибиторов выступают различные продукты метаболизма глутамина. Кроме того, в регуляции уровня азота в клетке и поддержании работы глутаминсинтетазы в период резкого повышения внутриклеточных концентраций аммония участвует система белков, осуществляющих ковалентные модификации фермента [11]. Каждая из субъединиц глутаминсинтетазы может подвергаться процессу аденилирования – связывания с активным центром аденозинмонофосфатных групп, что приводит к инактивации субъединицы. Процесс аденилирования сопровождается заменой кофактора с двухвалентного иона магния на марганец. Белки-модификаторы также катализируют реакцию деаденилирования – удаления аденозинмонофосфатных групп и восстановления активности субъединицы. Совокупная система регуляторных каскадов характеризуется высокой степенью чувствительности к отношению концентраций глутамина и α -кетоглутарата в клетке [12,13].

Двухвалентные ионы играют важную роль в процессе катализа, выступая в роли активаторов и взаимодействуя с γ -фосфатом адено-

Сокращение: GS – глутаминсинтетаза.

зинтрифосфата и γ -карбоксилатом глутамата [6, 14]. Помимо этого, ионы также выполняют структурную функцию, к которой относится стабилизирование четвертичной структуры фермента. Общеизвестно, что ион магния является наиболее физиологически важным, поскольку максимальная активность неаденилированных субъединиц при его участии достигается при pH 7,5 [15]. В активном центре GS существуют два сайта связывания двухвалентных ионов с различной аффинностью [16], однако точный механизм активации единичного фермента в условиях *in vivo* в настоящее время до конца не известен. В настоящей работе проводится математическое моделирование активности GS из *E. coli*. Показано, что связывание Mg^{2+} происходит только со свободной формой фермента.

МЕТОДЫ

Для моделирования каталитического цикла GS использовали метод генерации активности белка, основанный на стохастическом подходе [17]. Для N молекул белка в моделируемой системе вероятность нахождения фермента в свободном состоянии или в комплексе с субстратом A имеет вид:

$$P_E = \frac{N_E}{N_{EA+E}}; P_{EA} = \frac{N_{EA}}{N_{EA+E}}; N_E + N_{EA} = N, \quad (1)$$

$$K_d = \frac{[A][E]}{[EA]} = \frac{N_E}{N_{EA}} [A] \Rightarrow \frac{K_d}{[A]} = \frac{N_E}{N - N_E}, \quad (2)$$

где N_E – число молекул белка в свободном состоянии; N_{EA} – число молекул белка E в комплексе с A , K_d – константа диссоциации.

Тогда выражения для вероятностей в случае субстратзависимого, а также бессубстратного (конформационного) переходов имеют вид:

$$E + A \xrightleftharpoons[k_{off}]{k_{on}} EA \Rightarrow K_d = \frac{[A][E]}{[EA]} \Rightarrow \begin{cases} P_E = \frac{1}{1 + \frac{[A]}{K_d}}, \\ P_{EA} = \frac{1}{1 + \frac{K_d}{[A]}} \end{cases}$$

$$E_0 \xrightleftharpoons[k_-]{k_+} E_i \Rightarrow K_d = \frac{[E_i]}{[E_0]} = \frac{k_+}{k_-} \Rightarrow \begin{cases} P_{E_0} = \frac{1}{1 + K_{eq}}, \\ P_{E_i} = \frac{1}{1 + \frac{1}{K_{eq}}}. \end{cases} \quad (3)$$

Формальное обобщение этих процессов в аналитическом виде для случая многих состояний требует введения параметров, описывающих процессы потребления (производства) метаболитов и учитывающих направления переходов. Так, для индикации направления реакции используется параметр d , который может принимать значения -1 и 1 для реакций присоединения и отсоединения субстрата соответственно. Использование параметра потребления s , принимающего значения 0 и 1 для бес-субстратных и субстрат-зависимых переходов, позволяет унифицировать алгоритм расчета вероятностей в виде единой функциональной зависимости. Если исходить из соотношений (1)–(3), для системы из N состояний, характеризующих соответствующими константами K_j , полный вектор вероятностей имеет следующий вид:

$$\vec{P} = \left(\frac{1}{1 + \sum_{j=1}^N (K_j^d [A_j]^{-s_j d_j})}, \frac{K_2^d [A_2]^{-s_2 d_2}}{1 + \sum_{j=1}^N (K_j^d [A_j]^{-s_j d_j})}, \dots, \frac{K_N^d [A_N]^{-s_N d_N}}{1 + \sum_{j=1}^N (K_j^d [A_j]^{-s_j d_j})} \right), \quad (4)$$

где $K_j = \begin{cases} K_d, & s_j = 1, \\ K_{eq}, & s_j = 0. \end{cases}$

Построенная стохастическая модель на основе заданных входных параметров, сформированных в виде матриц, позволяет в каждый момент времени производить расчет вероятностей нахождения системы в одном из возможных состояний. На их основе, с учетом переменных времен переходов для каждой точки в пространстве концентраций, происходит оценка возможных состояний и расчет потоков метаболитов в зависимости от времени с последующим анализом скорости работы фермента. Дальнейший процесс валидации заключается в оптимизации параметров, соответствующих временам переходов между состояниями фермента.

Механизм каталитической реакции глутаминсинтетазы включает в себя образование 15 фермент-субстратных комплексов при участии шести метаболитов [18]. Данный механизм, без учета процесса активации, представлен на рис. 1. Используемый алгоритм позволяет провести компьютерный эксперимент по имитации протекания реакции, катализируемой GS, в результате чего можно получить совокупность значений стационарной скорости рассматриваемого процесса в зависимости от концентрации метаболитов системы. В дальнейшем экспериментальные точки аппроксимируют выбранной аналитической зависимостью.

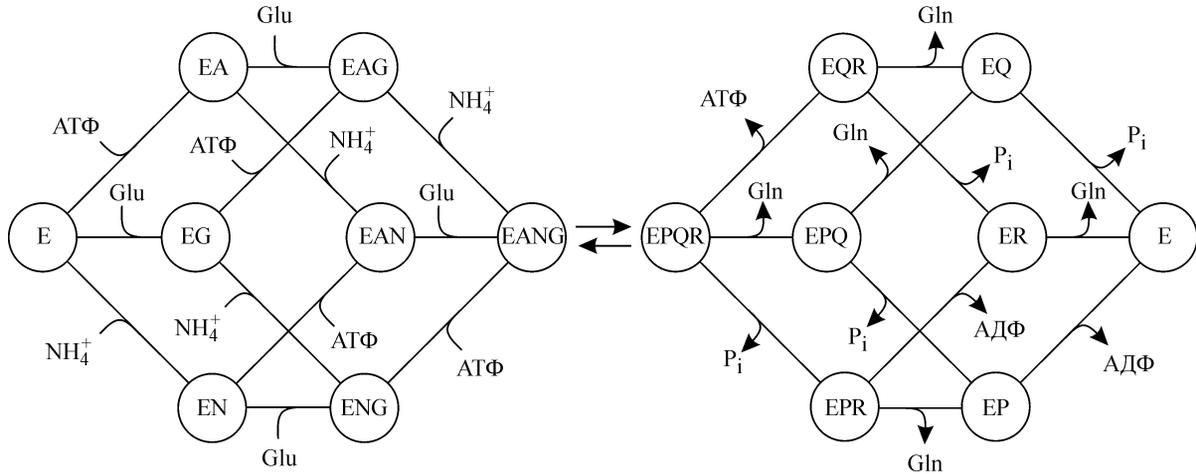


Рис. 1. Механизм реакции «Random Ter-Ter». E – глутаминсинтетаза в активной форме, А – АТФ, G – глутамат, N – аммоний, P – АДФ, Q – P_i, R – глутамин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование активированного фермента.

Результаты компьютерного моделирования активности GS в зависимости от концентрации субстратов реакции представлены на рис. 2. Описание данных компьютерных экспериментальных точек с использованием аналитических кривых позволяет провести оптимальный выбор времен переходов между состояниями GS. Критерием успешности валидации является совпадение параметров зависимостей (V_{max} , $K_{0,5}$) для реальных и варьируемых экспериментов (табл. 1). Аналогичный процесс оптимизации выбора параметров стохастической модели был проведен ранее на основании данных равновесного изотопного обмена [19].

Анализ параметров позволяет заключить, что для *E. coli* в условиях *in vivo* (17,3 мМ L-глутамата [20], 0,23–2,76 мМ АТФ [21]) реакция, катализируемая GS, находится в насыщении по глутамату (рис. 2а) и весьма чувствительна к изменению уровня АТФ (рис. 2б). Полученное значение $K_{0,5}$ указывает на высокую аффинность GS к NH_4^+ (рис. 2в). Такого рода высокая чувствительность к изменениям

в его концентрации может иметь решающее значение в адаптации клетки в период резкого увеличения концентрации аммония. Имеющиеся на сегодняшний день данные позволяют утверждать, что NH_3/NH_4^+ не являются токсичными для большинства исследуемых бактерий [22]. Необходимость быстрой адаптации для бактерий возникает чаще всего в случае, если клетка росла в условиях нехватки азота, а после произошло внезапное увеличение концентрации аммония. Для этого у прокариотической GSI существует гибкая система регуляторных модификационных каскадов [22].

Моделирование процессов активации. Зависимости скорости GS от концентраций субстратов, представленных выше, получены при условии насыщения систем по содержанию Mg^{2+} . Ранее было экспериментально установлено, что активация GS происходит за счет связывания свободной формы этого катиона [23]. Однако его уровень может значительно варьироваться в реальных условиях. Так, общая концентрация Mg^{2+} в *E. coli* находится в диапазоне 90–110 мМ [24]. В клетке магний, помимо свободной формы, может также находиться в виде комплексов с пирогосфатом (PP_i) и различными

Таблица 1. Сравнение значений полученных кинетических констант V_{max} и $K_{0,5}$ с данными из литературных источников [35]

	V_{max} , с ⁻¹		$K_{0,5}$, мМ	
	Результаты моделирования	Литературные данные	Результаты моделирования	Литературные данные
L-глутамат	12,1	11,7–14,3	2,3	1,8–4,2
АТФ	13,0	9,8–13,8	1,4	0,8–2,8
NH_4^+	16,3	13,2–17,6	0,13	0,13–0,19

нуклеозидтрифосфатами, которые являются субстратами для многих ферментов [25–27]. В связи с этим, уровень свободного магния зависит как от концентраций упомянутых метаболитов, так и от содержания рассматриваемых комплексов. Исходя из данных, представленных в табл. 2, средняя концентрация свободного магния в *E. coli* составляет величину порядка 1,7 мМ, что хорошо согласуется с экспериментальными данными [33,34].

В связи с этим важнейшим фактором, определяющим наличие синтеза глутамина в *E. coli*, является существование эффективного механизма активации GS ионами магния. На основании известных литературных данных можно предположить два возможных механизма этого процесса.

Особенностью механизма I является то, что ионы магния, находящиеся в свободном состоянии, могут связаться с каталитическими сайтами на ферменте вне зависимости от того, присоединились субстраты к активному центру или нет (рис. 3а). Таким образом, ионы могут связаться с сайтами до/во время/после присоединения субстратов. Строгий порядок сохраняется только в отношении последовательности присоединения ионов к сайтам связывания в соответствии с аффинностью последних. Продукты высвобождаются в полностью случайном порядке в соответствии со схемой «Random Ter-Ter» (рис. 1).

Для механизма II характерно то, что ионы Mg^{2+} последовательно в строгом порядке присоединяются только лишь к свободной форме фермента, образуя активированный комплекс EM_1M_2 , а после осуществляется связывание субстратов и отсоединение продуктов по случайному механизму (рис. 3б).

На рис. 4 представлены зависимости скорости работы GS от концентрации Mg^{2+} для двух исследуемых механизмов. При моделировании использовались следующие константы связывания ионов с активным центром: $K_1 = 5 \cdot 10^{-5}$ М, $K_2 = 10^{-3}$ М [35,11]. Значения кон-

Таблица 2. Экспериментальные значения концентраций и констант диссоциации для комплексов иона магния с различными нуклеотидами

K_d , мкМ		Концентрация, мМ		Ссылки
Mg-PP _i	500	PP _i	1,1 ± 0,2	[28,29]
Mg-АТФ	27,6	АТФ	2,76	[21,30]
Mg-ГТФ	32,4	ГТФ	0,7	[30,31]
Mg-ЦТФ	36,3	ЦТФ	1,2 ± 0,3	[30,31]
Mg-УТФ	37,2	УТФ	2,0 ± 0,5	[30,32]

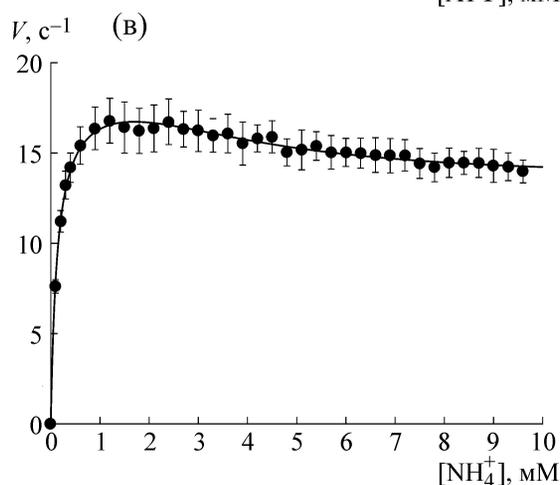
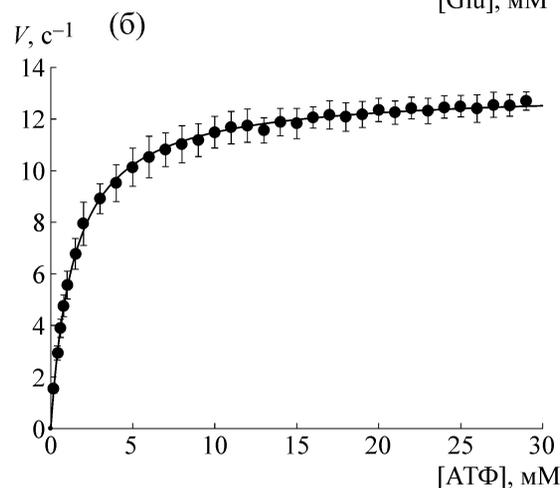
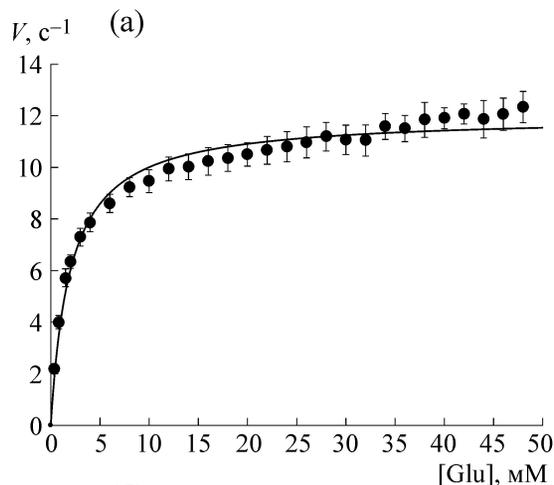


Рис. 2. Зависимости скорости работы глутаминсинтетазы от концентрации субстратов биосинтетической реакции: (а) – глутамата, (б) – АТФ, (в) – иона аммония. Для каждой точки в пространстве концентраций рассчитано среднее значение скорости и стандартное отклонение по серии из 25 экспериментов.

центраций субстратов принимались равными таковым в состоянии насыщения. Очевидно, что для активации фермента путем полностью

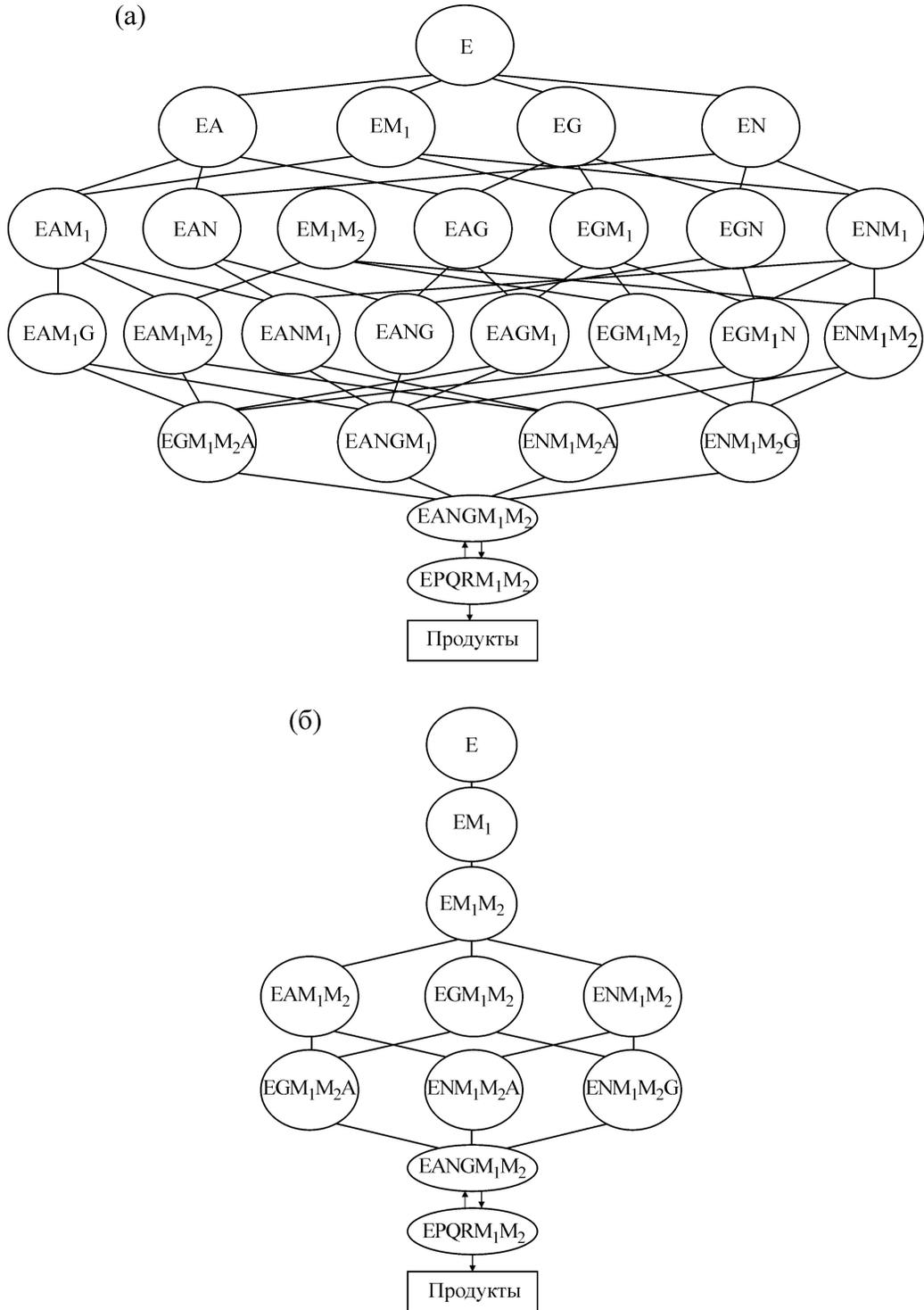


Рис. 3. (а) – Механизм I: активация глутаминсинтетазы путем полностью случайного последовательного связывания ионов свободного Mg²⁺ с ферментом. E – глутаминсинтаза в неактивной форме, А – АТФ, G – глутамат, N – аммоний, M₁, M₂ – ионы магния, P, Q, R – продукты реакции. (б) – Механизм II: активация GS путем последовательного связывания ионов Mg²⁺ исключительно со свободной формой фермента.

случайного связывания ионов требуется значительно более высокая концентрация Mg²⁺ в клетке, чем в случае механизма последовательного и упорядоченного связывания ионов.

Сравнение двух механизмов представлено на рис. 5. Видно, что кривая I, описывающая процесс активации GS по механизму случайного последовательного связывания ионов Mg²⁺

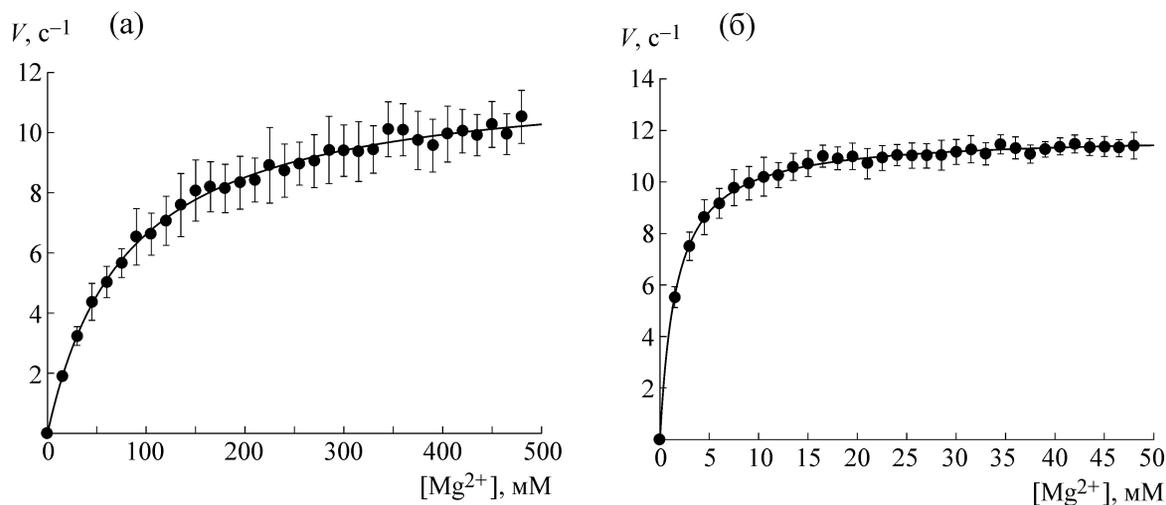


Рис. 4. Зависимости скорости работы глутаминсинтетазы от концентрации катионов Mg^{2+} : (а) – механизм I, (б) – механизм II.

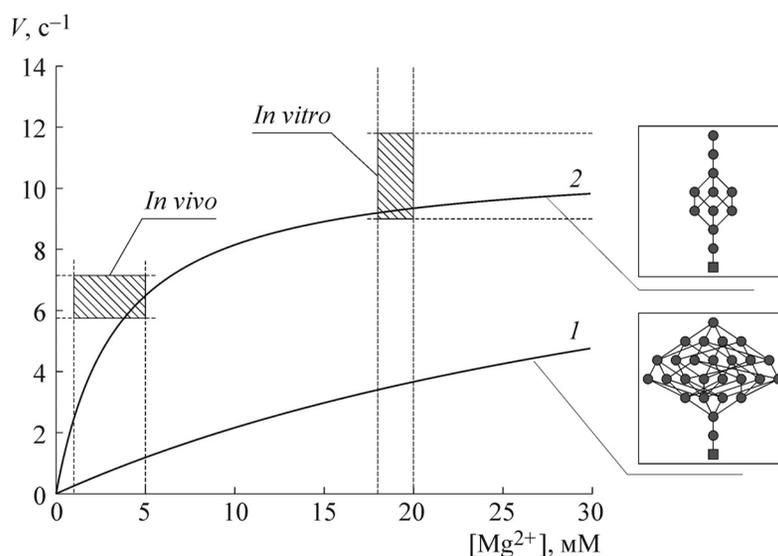


Рис. 5. Зависимости скорости работы GS от концентрации катионов Mg^{2+} : кривая 1 – механизм I, кривая 2 – механизм II.

(механизм I), не попадает в области скоростей *in vivo* и *in vitro* (рис. 5, кривая 1). Данные области получены для активированной формы фермента с учетом того, что в реакции участвовало порядка 1–5 mM [33] и 18 mM свободного Mg^{2+} (предполагается, что диссоциация $MgCl_2$ составляет порядка 80%) [36] соответственно. Ситуация существенно меняется для механизма последовательного связывания ионов магния исключительно со свободной формой фермента (механизм II). Так, кривая 2 проходит как через *in vitro*, так и *in vivo* область скоростей работы GS и концентраций Mg^{2+} (рис. 5). Примечательно, что моделирование стационарных скоростей реакции GS в условиях, аналогичных

упомянутым для рис. 2, но при содержании Mg^{2+} не в насыщении (18 mM), приводило к снижению активности на 75 и 25% для механизма I и механизма II соответственно.

Определение оптимальных путей связывания ионов металлов и субстратов с каталитическим центром белков является предметом активного изучения исследователей, поскольку существует большое количество ферментативных систем, в которых взаимодействие между кофактором, субстратами и белком до конца неизвестно. Первичное по отношению к субстратам связывание ионов металла было выявлено для различных ферментов. Так, бактериальная мембранная пирофосфатаза активируется путем

связывания катиона Mg^{2+} со свободной формой фермента, после чего возможно присоединение субстрата PP_i-Mg^{2+} [37]. Координация ионов металла и происходящие в связи с этим конформационные изменения секретированной фосфолипазы A_2 являются первичными по отношению к последующему связыванию субстрата и гидролизу [38]. Катионы магния необходимы для работы различных эндонуклеаз, к примеру, экспериментальные исследования эндонуклеазы рестрикции PvuII из *E. coli* показали, что наиболее эффективным является механизм, в ходе которого взаимодействию фермента с ДНК предшествует активация ионами Mg^{2+} [39]. Наконец, молекулярнодинамическое исследование мио-инозитолмонофосфатазы, требующей для активации три катиона Mg^{2+} , показало, что механизм, аналогичный механизму II настоящего исследования, является наиболее кинетически выгодным, однако не исключило связывание ионов до/во время присоединения субстратов в определенных условиях [40].

Таким образом, результаты работы позволяют сделать вывод о том, что активация бактериальной глутаминсинтетазы происходит за счет последовательного связывания ионов Mg^{2+} только со свободной формой фермента, что в полной мере подтверждается экспериментальными данными для аналогичных белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. Margelis, C. D'Souza, A. J. Small, et al., *J. Bacteriol.* **183**, 5826 (2001).
2. M. Spodenkiewicz, C. Diez-Fernandez, V. Rufenacht, et al., *Biology* **5**, 40 (2016).
3. R. J. Almassy, *Nature* **320**, 264 (1986).
4. Y. Kumada, D. R. Benson, D. Hillemann, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3009 (1993).
5. J. M. van Rooyen, V. R. Abratt, H. Belrhali, and T. Sewell, *Structure* **19**, 471 (2011).
6. D. Eisenberg, H. S. Gill, G. M. Pfluegl, and S. H. Rotstein, *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 122 (2000).
7. H. S. Gill and D. Eisenberg, *Biochemistry* **40**, 1903 (2001).
8. G. Pesole, C. Gissi, C. Lanave, and C. Saccone, *Mol. Biol. and Evolution* **12**, 189 (1995).
9. A. Purich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**, 220 (1983).
10. M. J. Ramos and P. A. Fernandes, *Molecules* **21**, 1028 (2016).
11. J. B. Hunt and A. Ginsburg, *Biochemistry* **11**, 3723 (1972).
12. P. B. Kidd and N. S. Wingreen, *Phys. Biol.* **7**, 016006 (2010).
13. R. C. Valentine and B. M. Shapiro, *Progr. Clin. Biol. Res.* **40**, 337 (1980).
14. W. W. Krajewski, in *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* (Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala, 2008), pp. 1–48.
15. L. M. Abell and J. J. Villafranca, *Biochemistry* **30**, 1413 (1991).
16. M. D. Denton and A. Ginsburg, *Biochemistry* **8**, 1714 (1968).
17. S. E. Boronovsky and Y. R. Nartsissov, *Bull. Math. Biol.* **78**, 1380 (2016).
18. F. C. Wedler and R. W. Barkley, *Anal. Biochem.* **177**, 268 (1989).
19. N. V. Kazmiruk, S. E. Boronovskiy, and Y. R. Nartsissov, *J. Phys.: Conf. Ser.* **917**, 042005 (2017).
20. K. R. Albe, M. H. Butler, and B. E. Wright, *J. Theor. Biol.* **143**, 163 (1990).
21. H. Yaginuma, S. Kawai, K. V. Tabata, et al., *Sci. Rep.* **4**, 6522 (2014).
22. W. C. van Heeswijk, H. V. Westerhoff, and F. C. Boogerd, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**, 628 (2013).
23. R. B. Timmons, S. G. Rhee, D. L. Luterman, and P. B. Chock, *Biochemistry* **13**, 4479 (1974).
24. M. L. J. Moncany and E. Kellenberger, *Experientia* **37**, 846 (1981).
25. B. Zhang, Y. Zhang, Z. Wang, and Y. Zheng, *J. Biol. Chem.* **275**, 25299 (2000).
26. N. M. Koropatkin, W. W. Cleland, and H. M. Holden, *J. Biol. Chem.* **280**, 10774 (2005).
27. S. Diamant, A. Azem, C. Weiss, and P. Goloubinoff, *Biochemistry* **34**, 273 (1995).
28. A. A. Baykov and S. M. Avaeva, *European J. Biochem.* **32**, 136 (1973).
29. J. Chen, A. Brevet, M. Fromant, et al., *J. Bacteriol.* **172**, 5686 (1990).
30. R. M. Smith, A. E. Martell, and Y. Chen, *Pure and Applied Chemistry* **63**, 1015 (1991).
31. K. R. Albe, M. H. Butler, and B. E. Wright, *J. Theor. Biol.* **143**, 163 (1990).
32. A. Danchin, L. Dondon, and J. Daniel, *Mol. Genetic and Genomic* **193**, 473 (1984).
33. S. Cayley, B. A. Lewis, H. J. Guttman, and M. T. Record, Jr., *J. Mol. Biol.* **222**, 281 (1991).
34. T. Alatosava, H. Jutte, A. Kuhn, and E. Kellenberger, *J. Bacteriol.* **162**, 413 (1985).
35. F. W. Dahlquist and D. L. Purich, *Biochemistry* **14**, 1980 (1975).
36. C. D. Listrom, H. Morizono, B. S. Rajagopal, et al., *Biochem. J.* **328**, 159 (1997).
37. A. Sosa, H. Ordaz, I. Romero, and H. Celis, *Biochemistry* **283**, 561 (1992).
38. F. Xie, S. H. Qureshi, G. A. Papadakos, and C. M. Dupureur, *Biochemistry* **47**, 12540 (2008).
39. V. Atanasov, S. Stoykova, H. Kolev, et al., *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **27**, 4181 (2014).
40. N. Ferruz, G. Tresadern, A. Pineda-Lucena, and G. De Fabritiis, *Sci. Rep.* **6**, 30275 (2016).

Modeling the Regulation of the Activity of Glutamine Synthetase from *Escherichia Coli* by Magnesium Ions

N.V. Kazmiruk, S.E. Boronovskiy, and Y.R. Nartsissov

Institute of Cytochemistry and Molecular Pharmacology, ul. 6-ya Radialnaya 24/14, Moscow, 115404 Russia

This work presents computer modeling of the activity of glutamine synthetase, a key component of nitrogen metabolism, catalyzing the synthesis of glutamine from glutamate and ammonia in an ATP-dependent reaction. To simulate the processes of substrate binding and activation the algorithm based on the stochastic approach was applied. Evaluation of the effects of free Mg^{2+} ions on the activity of glutamine synthetase was made and the optimal activation mechanism was determined. The major conclusion is that activation of bacterial glutamine synthetase *in vivo* is due to an ordered mechanism with the sequential Mg^{2+} ions binding first to the substrate free form.

Keywords: glutamine synthetase, stochastic modeling, magnesium, activity regulation, E. coli