

# ПРИМЕНЕНИЕ РАСЧЕТОВ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ БЕЛКОВ ПРИ ВЫБОРЕ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ МИКРОКАПСУЛИРОВАНИЯ

Сабурова Е. А., Дыбовская Ю. Н., Авсеенко Н. В.,  
Сивожелезов В. С.

(Россия, Пущино)

*Создание ферментативных полиэлектролитных микрореакторов выдвигает определенные требования к свойствам ферментов — изоэлектрической точке белка —  $pI$ , величине его полного заряда  $Q$ , но особенно важно точное знание распределения электростатического потенциала (РЭП) на поверхности белка. Настоящая работа посвящена расчету РЭП ряда белков с учетом различного локального окружения для каждого заряженного аминокислотного остатка и соответственно смещения величины  $pKa$ . Было рассчитано РЭП рибонуклеазы А и лизоцима при разных значениях  $pH$  4, 5, 6, 7, 8, применяя как обычно используемые стандартные значения величин  $pKa$ , так и с учетом локального окружения для каждого титруемого аминокислотного остатка белка. В результате сравнения таких расчетов показано, что учет окружения аминокислотного остатка изменяет РЭП ферментов, но в ограниченной области  $pH$  (3–5). Произведена оценка площадей с соответствующим РЭП на поверхности белка, потенциально способных связывать полиэлектролиты, составляющие оболочку фермент-полиэлектролитного комплекса. В интервале  $pH$  (5–8) расчет РЭП этих белков показал, что поправка на смещение величин  $pKa$  не вызывает заметных изменений РЭП и при построении надмолекулярных комплексов ее можно не учитывать.*

**Введение.** Электростатическое поле белковой молекулы является одной из ее важнейших физико-химических характери-

стик, влияющей на устойчивость пространственной структуры белка, а также определяющей скорость образования, конфигурацию и стабильность комплексов белков с клеточными компонентами разной степени полимеризации. Знание РЭП на белках является необходимой составной частью конструирования различного рода фермент-полиэлектролитных комплексов, используемых в производстве, науке и медицине. Ранее нами был предложен метод получения ферментативного полиэлектролитного микрореактора, в котором резко возрастает стабильность фермента; и в таком виде он может быть использован для качественного и количественного анализа непосредственно в различных биологических средах [1]. Нами показано, что не все полиэлектролиты одинаково эффективны для использования их в качестве оболочки для микрореактора, поскольку вызывают разрушение белка [2]. Наиболее оптимальную подборку полиэлектролитов можно осуществить только для ферментов с определенными свойствами. А для этого необходимо знать не только изоэлектрическую точку белка  $pI$ , величину его полного заряда  $Q$ , но и точное распределение электростатического потенциала на поверхности белка [3].

Ранее нами были выполнены расчёты электрического потенциала ферментов лактатдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы с помощью решения уравнения Пуассона-Больцмана численным методом с использованием метода Гаусса-Зейделя при разных значениях  $pH$ . На основе полученных расчетов и графических представлений данных определены довольно протяженные площади на поверхности белков с «положительным» потенциалом в нейтральной области  $pH$ , представляющие участки для благоприятного связывания полианионов. В расчетах РЭП этих белков мы использовали стандартные значения величин  $pK_a$  титруемых аминокислотных остатков, приведенные в справочной литературе [4]. Однако известно, что локальное окружение этих остатков значительно смещает величину  $pK_a$ , в ряде случаев на несколько единиц, причем как с увеличением, так и с уменьшением этого значения [5–10]. Настоящая работа посвящена расчету РЭП ряда белков с учетом различного локального окружения для каждого заряженного аминокислотного остатка,

который состоит в введении поправок на смещение величины рКа. Для этой задачи были выбраны ферменты, для которых экспериментально получены точные значения рКа для каждой заряженной группы: РНКаза А из поджелудочной железы быка и лизоцим из куриного яичного белка. Было рассчитано РЭП РНКазы и лизоцима при разных значениях рН 4, 5, 6, 7, 8, применяя как стандартные значения величин рКа, так и значения с учетом локального окружения для каждого титруемого аминокислотного остатка белка. Такие расчеты возможно проделать пока только с низкомолекулярными белками в несколько десятков кД, для которых известно истинное значение рКа для каждого заряженного аминокислотного остатка, а именно определенное экспериментально. Экспериментально измерить величины рКа всех заряженных остатков в белке — задача достаточно сложная и поэтому в настоящее время имеется лишь небольшое число низкомолекулярных белков, для которых известны такие данные [11–13]. Задачей настоящего исследования было оценить, как отклонение истинных величин рКа аминокислотных остатков от стандартно используемых влияет на РЭП на поверхности белков.

**Методы.** Потенциал считали с помощью решения уравнения Пуассона-Больцмана численным методом, в частности мы использовали метод Гаусса-Зейделя, используя координаты атомов PDB банка [14, 15]. Далее в графической программе «MOLMOL 2.5.1» сделали рисунки распределения потенциала по поверхности при различных рН с учетом и без учета микроокружения аминокислотных остатков. Черным цветом окрашены поля со значением потенциала в интервале  $[0.5, +\infty)$ ; серым цветом обозначены поля со значением потенциала  $(-0.5; +0.5)$ , и белым — со значением потенциала в интервале  $(-\infty; -0.5]$ . Рисунки нарисованы в развернутом виде так, чтобы можно было видеть стороны белка: вид спереди и вид сзади.

Заряды на аминокислотных остатках распределяли по уравнению Гендерсона-Хассельбалха [4] в соответствии с точными экспериментально измеренными [11–13] и теоретически выверенными [5–10] величинами рКа (см. табл. 1). Для сравнения расчеты РЭП этих же белков были произведены по тому же

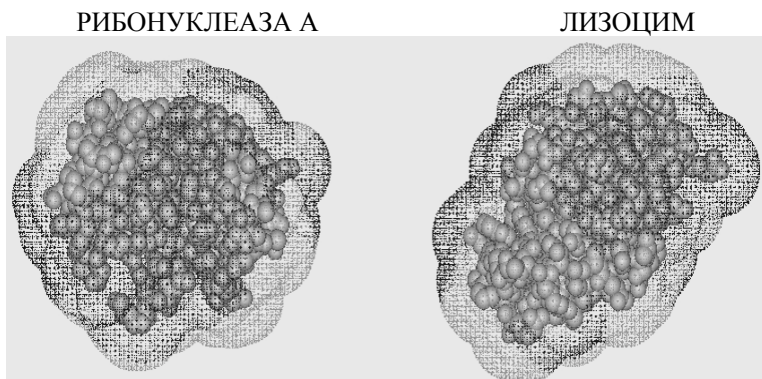
уравнению, но с величинами  $pK_a$  без учета окружения, т.е. со стандартными значениями, которые используются обычно в литературе: для His  $pK_a = 6.6$ , Glu 4.5, Asp 4.5 [4].

Площади пятен, образованных полями с положительным и отрицательным потенциалами, рассчитывали как площади проекции пятен на соответствующую плоскость системы координат. Для каждого пятна систему координат выбирали таким образом, чтобы площадь проекции пятна на нее была максимальна. Такой расчет, мы полагаем, оптимальный, поскольку для дальних взаимодействий, к которым относятся кулоновские взаимодействия, вогнутые и выпуклые поверхности аппроксимируются их проекциями на плоскость, перпендикулярную указанному направлению. Приведены значения площадей только тех участков, площади которых не меньше, чем 3 % максимальной.

**Результаты и обсуждение.** В настоящей работе мы рассмотрели роль электростатики во взаимодействиях белков с другими заряженными молекулами, в том числе с полиэлектролитами, т.е. роль поля за пределами белковой глобулы на расстоянии 5.5 Å от атома. Такой способ визуализации, предложенный Сивожелезовым В.С. [16], основан на том, что в этом случае расстояние от точки наблюдения потенциала до ближайшего заряда, принадлежащего белку, составляет около 7 Å. Последняя величина называется Бьёррумовой длиной и равна расстоянию, на котором два единичных заряда взаимодействуют в воде при комнатной температуре с энергией, равной энергии теплового движения [17]. Таким образом, значения вычисляемых нами потенциалов таковы, что соответствующие энергии взаимодействия существенны на фоне энергии теплового движения.

На рис. 1 приведены для иллюстрации РЭП РНКазы и лизоцима при значении pH 4 в трехмерном виде, выполненные без учета окружения титруемых аминокислотных остатков. Бледным полем нанесено РЭП, отстоящее от молекул белка на расстоянии 5.5 Å. Как видно из рис. 1, РЭП на указанном расстоянии от ван-дер-ваальсовых радиусов отнюдь не повторяет распределения поля на самих атомах, а сильно зависит от экранирования поля атома соответствующим микроокружением. Микроокружение в рассмотренных белках приводит к практически

полному отсутствию отрицательного потенциала на поверхности РЭП обоих белков даже в районе отрицательно заряженных аминокислотных остатков. Это особенно четко видно на рис. 2, 3 на которых представлены РЭП для обоих белков в разных проекциях и при pH 4.



**Рис. 1.** Распределение электростатического потенциала на поверхности рибонуклеазы А (слева) и лизоцима (справа) на расстоянии 5.5 Å. от ван-дер-ваальсовых радиусов; pH 4, ионная сила 0.1. Плотными шариками показана сама молекула белка, построенная по координатам PDB банка.

Значения  $pK_a$ , используемые в расчете РЭП для обоих белков приведены в таблице 1. Как видно из таблицы, наибольшие смещения величин  $pK_a$  имеют в основном кислые аминокислотные остатки, причем смещение сильнее для Asp, чем для Glu в сторону снижения. Исключением является Glu35 в лизоциме, для которого  $pK_a$  увеличивается, вместо обычного уменьшения более чем на 1.3 ед. pH.

**Таблица 1. Значения рКа, используемые в расчете РЭП для РНКазы и лизоцима [8]**

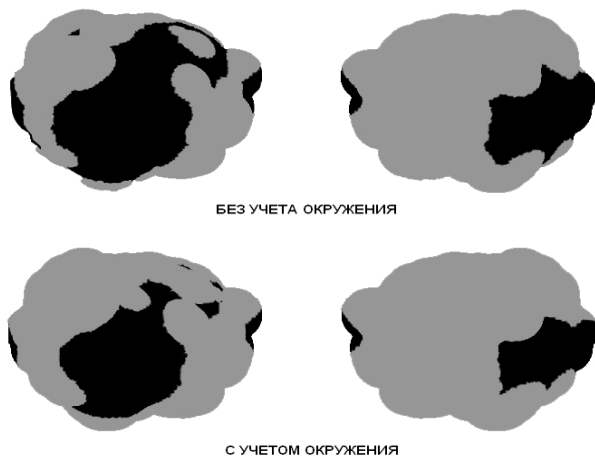
рКа			
рибонуклеаза А		лизоцим	
His 15	5.68	His 12	5.83
Asp 66	2.62	His 119	6.25
Asp 48	3.11	His 48	6.44
Asp 119	3.11	His 105	7.10
Asp 87	3.14	Asp 14	2.62
Asp 52	3.49	Asp 83	3.11
Asp 18	3.52	Asp 38	3.81
Asp 101	4.18	Asp 121	3.92
Glu 7	3.74	Asp 53	3.95
Glu 35	5.87	Glu 86	3.76
		Glu 2	3.84
		Glu 49	4.34
		Glu 111	4.37
		Glu 9	4.56

Как видно из рис. 2, и 3 и лизоцим, и РНКазы имеют большие протяженные области с положительным потенциалом, причем разрывы этих областей происходят только при рН 8 (рис. не приведен, см. табл. 2). Величины площадей пятен с положительным потенциалом численно представлены в таблице 2. Эти значения рассчитаны нами для РНКазы и лизоцима при значениях рН 4, 5, 6, 8. Значения площадей пятен приведены в таблице 2 в порядке убывания. Отдельные пятна делятся на более мелкие при увеличении рН. Отсутствие белых пятен вплоть до рН 8 на РНКазе и полное их отсутствие на лизоциме естественно, поскольку оба эти белка

имеют большой избыток основных аминокислотных остатков по сравнению с содержанием кислых групп — почти в два раза и имеют рI около 10 и 11 соответственно. Протяженные области положительного потенциала на молекулах белков определяют высокое связывание анионных полиэлектролитов в случае образований капсул с одной стороны, и более сильный ингибиторный эффект в результате разрушения структуры белка с другой. Это показано нами ранее на мультисубъединичных белках с разным по локализации распределением электростатического потенциала [2]. Выбор белков РНКазы и лизоцима для расчета РЭП определялся нами также, исходя из того, что оба эти белка денатурируют обратимо, а это означает, что изменения структуры белка, которые неизбежно должны быть в результате комплексообразования с полиэлектролитами, как показывает эксперимент, могут обратимо восстанавливаться при распаде комплекса. Именно это свойство фермент-полиэлектролитных комплексов — обратимое восстановление структуры при распаде комплекса — определяет возможность его использования в виде таких комплексов.



**Рис. 2.** Распределение электростатического потенциала на поверхности лизоцима. Черным цветом обозначено поле с положительным потенциалом в интервале  $(0.5, +\infty)$ ; серым цветом —  $(-0.5; +0.5)$ , и белым — со значением потенциала в интервале  $(-\infty; -0.5]$



**Рис. 3.** Распределение электростатического потенциала на поверхности рибонуклеазы А

Как видно из рис. 2–3 и таблицы 2, расчет РЭП на обоих белках указывает на значительные изменения в РЭП, вызванные смещением рКа в результате специфического микроокружения заряженных остатков в обоих белках. Это отражено на форме и размерах областей с положительным потенциалом (черные пятна)  $S_{\text{учет}}$  и  $S_0$ .

Смещения рКа Glu и Asp в кислую сторону приводят к значительному уменьшению площадей с положительным потенциалом (см. табл. 2), примерно в полтора раза при рН 4. В области рН 6–8 эти смещения практически не изменяют РЭП на белках — как видно из табл. 2, величины площадей  $S_{\text{учет}}$  и  $S_0$  практически не изменяются.

**Таблица 2. Значения величин площадей потенциальных участков для связывания отрицательно заряженных молекул на ферментах РНКазы и Лизоцима с учетом  $S_{\text{учет}}$  и без учета  $S_0$  микроокружения аминокислотных остатков соответственно.  $f$  – отношение  $S_0/S_{\text{учет}}$**

Фермент	рН	$S_0, \text{Å}^2$	$S_{\text{учет}}, \text{Å}^2$	$f$
Рибонуклеаза А	4.0	1537.66	893.11	1.7
		978.45	695.03	1.4
		170.44	124.44	1.4
	6.0	645.71	641.37	1.01
		193.35	182.76	1.05
		53.46	50.34	1.06
	8.0	414.77	412.68	1.01
		50.66	49.01	1.03
		21.55	20.8	1.03
Лизоцим	4.0	2340.19	1595.9	1.5
		985.41	574.39	1.7
		378.07	270.05	1.4
	6.0	356.54; 192.22;	348.31; 186.11;	1.02
		645.81	481.76	
		318.12	175.15; 135.9	
		16.46	-----	
	8.0	155.2; 195. 6; 173.8;	155.2; 195. 6; 173.8;	
		339.8	339.8	
169.2; 112.3		169.23; 112.33		
	-----	-----		



**Выводы.** В результате такого расчета показано, что учет окружения заряженных аминокислотных остатков изменяет распределение ЭП на поверхности ферментов, но в ограниченной области рН (3–5). В области рН 6 и выше учет окружения аминокислотных остатков для рассмотренных белков при расчете распределения ЭП можно не осуществлять. Это вызвано спецификой смещений величины рКа преимущественно кислых аминокислотных остатков, определяемой расположением их в изолированной от растворителя области. Величина смещения рКа коррелирует с гидрофильностью микроокружения, которая, в свою очередь, определяет величину диэлектрической постоянной, входящей в уравнение Пуассона – Больцмана.

Выполненные расчеты позволяют применять полученные результаты к другим белкам, особенно белкам с высоким молекулярным весом, для которых измерение точных значений величин рКа затруднено.

#### **Список литературы:**

1. Бобрешова М., Сухоруков Г.Б., Сабурова Е.А., Елфимова Л.И., Шабарчина Л.И., Сухоруков Б.И. // Биофизика. 1999. Т.44. №5. С.813–820.
2. Сабурова Е.А., Бобрешова М.Е., Елфимова Л.И., Сухоруков Б. И. // Биохимия. 2000. Т.65. №8. С.1151–1161.
3. Сабурова Е.А., Дыбовская Ю.Н., Сивожелезов В.С., Елфимова Л.И. Электростатический вклад во взаимодействие некоторых белков с полиэлектролитами // Биофизика. 2005 (в печати).
4. Кантор Ч., Шимемел П. Биофизическая химия. М.: «Мир», 1984. 336с.
5. Yang A.S., Gunner M.R., Sampogna R., Sharp K., Honig B. On the calculation of pKas in proteins // Proteins. 1993. Т.15. №3. С.252–65.
6. Antosiewicz J., McCammon J.A., Gilson M.K. The determinants of pKas in proteins // Biochemistry. 1996. Т.35. №24. P.7819–33.
7. Elcock AH. Realistic modeling of the denatured states of proteins allows accurate calculations of the pH dependence of protein stability // J. Mol. Biol. 1999. V.294. №4. P.1051–1062.

8. Mehler E.L., Guarnieri F. A self-consistent, microenvironment modulated screened coulomb potential approximation to calculate pH-dependent electrostatic effects in proteins // *Biophys J.* 1999. V.77. №1. P.3–22.
9. Fitch C.A., Karp D.A., Lee K.K., Stites W.E., Lattman E.E., Garcia-Moreno E.B. Experimental pK(a) values of buried residues: analysis with continuum methods and role of water penetration // *Biophys J.* 2002. V.82. №6. P.3289–3304.
10. Mehler E.L., Fuxreiter M., Simon I., Garcia-Moreno E.B. The role of hydrophobic microenvironments in modulating pKa shifts in proteins // *Proteins.* 2002. V.48. №2. P.283–292.
11. Antosiewicz J., McCammon J.A., Gilson M.K. Prediction of pH-dependent properties of proteins. // *J. Mol. Biol.* 1994. V.238. P.415–436.
12. Bartik K., Redfield C., Dobson C.M. Measurement of the individual pKa values of acidic residues of hen and turkey lysozymes by two-dimensional NMR // *Biophys. J.* 1994. V.66. P.1180–1184.
13. Kuramitsu S., Hamaguchi K. Analysis of the acid-base titration curve of hen lysozyme // *J. Biochem.* 1980. V.87. P.1215–1219.
14. Dung M.H., Bell J.A. Structure of crystal form IX of bovine pancreatic ribonuclease // *Acta Crystallogr.* 1997. V.53. P.419.
15. Ramanadham M., Sieker L.C., Jensen L.H. Refinement of triclinc lysozyme: II. The method of stereochemically restrained least squares // *Acta Crystallogr.* 1990. V.46. P.63.
16. Sivozhelezov V.S. Interpretation of Ionic Strength Dependencies of the Electron Transfer in the Cytochrome c–Cytochrome b5 System for the Wild-type and Lysine-mutated Yeast Cytochrome c // *Molecular Engineering.* 1996. V.6. №4. P.405–414.
17. Dzhelyadin T.R., Sorokin A.A., Sivozhelezov V.S., Ivanova N.N., Polozov R.V., Kamzolova S.G. New approach in studying RNA polymerase-promoter recognition code // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2001. V.18. P.922–923.

**THE APPLICATION OF CALCULATIONS OF THE  
ELECTROSTATIC FIELD OF PROTEINS IN THE CHOICE  
OF ENZYMES FOR MICROCAPSULATION**

**Saburova E. A., Dybovskaya Yu. N., Avseenko N. V.,  
and Sivozhelezov V. S.**

(Russia, Puschino)

*In the development of enzyme polyelectrolyte microreactors, some properties of enzymes, e. g., the isoelectric point of the protein  $pI$ , i. e., the value of its full charge  $Q$ , should be taken into account. However, of particular importance is exact knowledge of the distribution of the electrostatic potential on the surface of the protein. This paper is devoted to the calculation of the distribution of the electrostatic potential of some proteins with consideration of the local microenvironment for every charged amino acid residue and accordingly a change in the  $pK_a$  value. The distribution of the electrostatic potential of ribonuclease A and lysozyme was calculated at different pH values 4,5, 6, 7 and 8, using both standard  $pK_a$  values and  $pK_a$  values corrected for local microenvironment for every titrated amino acid residue of the protein. A comparison of these calculations showed that taking the microenvironment of amino acid residue into account changes the distribution of the electrostatic potential of enzymes in the limited pH range (3–5). The areas of regions with the corresponding distribution of the electrostatic potential on the protein surface that are capable of binding to the polyelectrolyte were calculated. The analysis of the distribution of the electrostatic potential in the pH range 5–8 of these proteins showed that the correction for the change in the  $pK_a$  values does not appreciably affect the distribution of the electrostatic potential and that it can be neglected when constructing permolecular complexes.*