

УДК 577.2

Структура димера трансмембранного домена гликофорина А в окружении липидов и детергентов

К. С. Минеев, Э. В. Бочаров*, П. Е. Волынский, М. В. Гончарук, Е. Н. Ткач, Я. С. Ермолюк, А. А. Шульга, В. В. Чупин, И. В. Масленников, Р. Г. Ефремов, А. С. Арсеньев

Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: bon@nmr.ru

Поступила в редакцию 24.02.2011 г.

РЕФЕРАТ Специфические взаимодействия между трансмембранными α -спиралями во многом определяют биологическую функцию мембранных белков при нормальном развитии организма и в его патологических состояниях. Для изучения структурно-динамических особенностей, определяющих олигомеризацию трансмембранных α -спиралей, используют различные мембраноподобные среды, которые отчасти воспроизводят условия многокомпонентных биологических мембран. Состав мембраноподобной среды выбирают так, чтобы трансмембранный белковый комплекс имел биологически значимую конформацию, а стабильность образца позволяла проводить серию длительных экспериментов. В настоящей работе методами гетероядерной спектроскопии ЯМР и молекулярной динамики на примере димеризующегося трансмембранного домена битопного белка гликофорина А показано, что две широко используемые среды в виде детергентных мицелл ДФХ и липидных бицелл ДМФХ/ДФХ позволяют проводить структурно-динамические исследования специфических взаимодействий между трансмембранными α -спиралями. Однако ряд особенностей ставит липидные бицеллы ближе по своим характеристикам к природному липидному бислою.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА мембраноподобные среды, битопные мембранные белки, трансмембранный домен, димеризация, пространственная структура, молекулярная динамика, спектроскопия ЯМР.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ТМ – трансмембранный; GrAtm – фрагмент гликофорина А, GrA₆₁₋₉₈, содержащий ТМ-домен; ДФХ – додецилфосфохолин; ДМФХ – димиристоилфосфатидилхолин; ДГФХ – дигексаноилфосфатидилхолин; СКО – среднеквадратичное отклонение; ЯЭО – ядерный эффект Оверхаузера; NOESY – ЯМР-спектроскопия ЯЭО; HSQC – гетероядерная одноквантовая корреляция.

ВВЕДЕНИЕ

Мембранные белки, составляя более 25% протеома [1], обеспечивают уникальность биологической роли каждой клеточной мембраны и определяют ее физико-химические свойства. Важнейшие процессы в клетке, такие, как межклеточная рецепция и коммуникация, молекулярный и ионный транспорт, слияние мембран и т.д., непосредственно связаны с участием мембранных белков. Взаимодействие между трансмембранными (ТМ) доменами белков, способных олигомеризоваться в мембране, во многих случаях важно для проявления их активности. Так называемые битопные мембранные белки, имеющие только один ТМ α -спиральный сегмент, играют ключевую роль во многих биологических процессах в организме человека. Регуляция активности битопных белков в большинстве случаев сопряжена с гомо- или гетеродимеризацией в клеточной мембране при непосредственном участии их ТМ-доменов [2, 3]. К этому

классу белков принадлежит большая часть рецепторных протеинкиназ, иммунорецепторов и апоптозных белков, которые принимают непосредственное участие в управлении развитием и гомеостазом всех тканей организма как в норме, так и при патологических состояниях.

Для изучения физических параметров взаимодействия ТМ-доменов белков методом спектроскопии ЯМР в растворе необходимо поместить их в среду, имитирующую клеточную мембрану [4]. Для получения спектров ЯМР высокого качества необходимо, чтобы размер частиц такой среды был относительно небольшим, а стабильность образца позволяла проводить серию длительных экспериментов. В то же время очень важно подобрать адекватный состав мембраноподобной среды, в которой ТМ-белковый комплекс имеет биологически значимую конформацию. На настоящий момент широкое применение получили два класса сред, имитирующих мембранное

окружение – детергентные мицеллы, имеющие сферическую форму, и фосфолипидные бицеллы, которые, как полагают, имеют дисковидную форму [5].

В представленной работе методами гетероядерной спектроскопии ЯМР и молекулярной динамики впервые в мире проведено сравнительное исследование влияния разных мембраноподобных сред на конформацию димеризующегося ТМ-домена битопного белка. Гликофорин А (GrA) – антигенпредставляющий белок на поверхности эритроцитов человека – широко используется как модельный объект для отработки экспериментальных и теоретических методик изучения пространственной структуры и внутримолекулярной динамики взаимодействующих ТМ-доменов битопных белков. Именно для ТМ-домена GrA, солюбилизованного в мицеллах, была впервые установлена пространственная структура ТМ-димера, хотя до сих пор остались некоторые неопределенности в его строении [6–8]. Для оценки степени влияния мембраноподобного окружения на конформацию взаимодействующих ТМ α -спиралей в настоящей работе были исследованы структурно-динамические характеристики гомодимера ТМ-фрагмента GrA_{61–98} (GrAtm) в двух средах: детергентных мицеллах из додецилфосфохолина (ДФХ) и липидных бицеллах из смеси димиристоилфосфатидилхолина/дигексаноилфосфатидилхолина (ДМФХ/ДГФХ).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение ЯМР-образцов рекомбинантного ТМ-фрагмента GrA_{61–98} (GrAtm) в мембраноподобных средах

Рекомбинантный пептид, соответствующий фрагменту R⁶¹VQLANHFSEPEITLIIFGVMAGVIGTILLISYGI⁹⁸ GrA человека (GrAtm), включающий ТМ-домен (подчеркнут), был получен по методу [9, 10]. Для проведения ЯМР-исследований в качестве мембраноподобных сред использовали детергентные мицеллы ДФХ и небольшие бицеллы ДМФХ/ДГФХ с молярным соотношением липидов 1 : 4. Использовали полностью дейтерированный детергент d_{38} -ДФХ (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, США), а также липиды d_{54} -ДМФХ и d_{22} -ДГФХ с дейтерированными ацильными цепями, синтезированными как описано в [11]. Сухие порошки белка и детергента или липидов растворяли в смеси трифторэтанол–вода 1 : 1 (v/v), а затем лиофилизировали. Сухой порошок растворяли в буфере, содержащем дейтерированный ацетат натрия (20 мМ, рН 5.0, 5% D₂O), EDTA (1 мМ) и азид натрия (0.05 мМ), и проводили по пять циклов замораживания-нагрева (до ~ 40°C) с последующим озвучиванием в течение нескольких минут в ультразвуковой бане до полной

прозрачности раствора. Все образцы готовили из расчета 2 мМ GrAtm в 0.5 мл раствора мицелл или бицелл с молярным соотношением пептид/детергент или липиды приблизительно 1 : 35, что обеспечивает содержание примерно двух молекул ТМ-пептида на мицеллу/бицеллу (при этом с учетом критической концентрации мицеллообразования липидов эффективное соотношение количества длинных и коротких липидов в бицелле $q \approx 0.3$). В обеих мембраноподобных средах были приготовлены по три образца димера GrAtm с использованием только ¹⁵N-меченного или ¹⁵N/¹³C-меченного ТМ-пептида, а также смеси 1 : 1 из ¹⁵N/¹³C-меченного и немеченного ТМ-пептида («изотопно-гетеродимерный» образец).

Размер мицелл и бицелл со встроенным GrAtm, а также его вторичную структуру контролировали с помощью оптических методов – динамического светорассеяния и кругового дихроизма. Эксперименты по динамическому светорассеянию проводили на установке DynaPro Titan (Wyatt Technology Corporation, США) в 12 мкл кювете при температуре 30°C. Спектры кругового дихроизма для GrAtm, встроенного в мицеллы, бицеллы или липосомы (фосфолипидный бислой), получали на спектрополяриметре J-810 (Jasco, Япония) в 0.1 мм кварцевой кювете при температуре 30°C и концентрации пептида 1 мг/мл. Спектры кругового дихроизма анализировали с использованием программы CDSSTTR [12]. Для приготовления небольших однослойных везикул суспензию липосом из ДМФХ при соотношении пептид/липид 1 : 50 обрабатывали ультразвуком во льду при помощи ультразвукового дезинтегратора с титановым наконечником (VirSonic-600, США) до полной прозрачности образца (примерно 10 мин).

ЯМР-спектроскопия, расчет и релаксация пространственной структуры димера ТМ-фрагмента GrA_{61–98}, солюбилизованного в мембраноподобных средах

ЯМР-спектры GrAtm, солюбилизованного в мицеллах ДФХ и бицеллах ДМФХ/ДГФХ при рН 5.0 и 40°C, получены на спектрометрах UNITY (Varian, Palo Alto, CA, США) и AVANCE-III (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Германия) с рабочими частотами на протонах 600 МГц. Анализ ЯМР-спектров проводили с использованием программы CARRA [13]. Отнесения ¹H-, ¹³C- и ¹⁵N-резонансов пептида и получение структурной информации проводили по стандартной методике с использованием экспериментов тройного резонанса [14, 15]. Информация о внутримолекулярной динамике ТМ-пептида получена на основе анализа ¹⁵N-релаксационных данных: значений гетероядерного ¹⁵N{¹H} ЯЭО, времен продольной (T_1) и поперечной (T_2) релаксации, а также эффективных

времен вращательной корреляции (τ_R), измеренных по методике, описанной в [16]. Скорости обмена амидных протонов на дейтерий растворителя оценены из изменения интенсивностей сигналов в наборе спектров $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC, последовательно накопленных в течение суток для растворенных в D_2O образцов GrAtm, предварительно встроенных в мицеллы или бицеллы и лиофилизированных.

Расчет пространственной структуры осуществлен по стандартной методике [14] в программе CYANA 3.0 [17] с использованием метода молекулярной динамики в пространстве двугранных углов и алгоритма «моделируемого отжига» (simulated annealing). Ограничения на межпротонные внутримonomерные расстояния получены из объемов кросс-пиков ЯЭО в спектрах $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC и $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC, накопленных со временем смешивания $t_m = 80$ мс. Межmonomерные контакты ЯЭО на интерфейсе димеризации GrAtm получены из спектра 3D $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -F1-filtered/F3-separated-NOESY-HSQC ($t_m = 80$ мс) с использованием «изотопно-гетеродимерного» образца [15]. Диапазоны двугранных углов ϕ , ψ и χ^1 основной цепи белков оценивали из значений ^1H , ^{15}N и ^{13}C химических сдвигов NH-, C α H- и CO-групп GrAtm в программе TALOS [18]. Ограничения на водородные связи добавлены после предварительного расчета структуры на основе анализа данных по скоростям обмена амидных протонов на дейтерий растворителя и пространственной близости амидных протонов и атомов кислорода основной цепи GrAtm в предварительном наборе структур. Были введены следующие ограничения: для углов $140^\circ < \text{NHO} < 180^\circ$ и $130^\circ < \text{COH} < 170^\circ$ и расстояний $1.9 \text{ \AA} \leq d(\text{O}, \text{H}^N) \leq 2.3 \text{ \AA}$, $3.0 \text{ \AA} \leq d(\text{O}, \text{N}) \leq 3.4 \text{ \AA}$, $3.2 \text{ \AA} \leq d(\text{C}, \text{H}^N) \leq 3.6 \text{ \AA}$ [19]. В результате на основе верхних ограничений на межпротонные расстояния (с учетом стереоспецифического отнесения групп пептида), а также ограничений на двугранные углы ϕ , ψ и χ^1 и на водородные связи рассчитаны наборы из 200 структур для GrAtm, встроенного в мицеллы или бицеллы. Из этих наборов в качестве репрезентативных были выбраны по 20 структур с наименьшими значениями штрафной функции.

Энергетическую релаксацию репрезентативных ЯМР-структур димера GrAtm проводили соответственно в явно заданных гидратированных мицеллах ДФХ (60 молекул) или бислое ДМФХ (512 молекул) методом молекулярной динамики (МД) с использованием программного пакета GROMACS 3.3.1 [20] как подробно описано в [21]. После уравнивания и минимизации энергии системы рассчитывали траектории МД длительностью 2 нс с фиксированным положением атомов димера GrAtm, затем 10 нс с экспериментальными ЯМР-ограничениями на рас-

стояния и, наконец (для оценки стабильности системы), 10 нс без каких-либо ограничений.

Для анализа и визуализации пространственных структур использовали программы CYANA 3.0, MOLMOL [22] и RYMO [23]. Гидрофобные свойства поверхности α -спиралей рассчитывали с использованием подхода молекулярного гидрофобного потенциала (МГП) [24]. Площадь контакта между α -спиралями рассчитывали с использованием программы DSSP [25] как разность площадей доступной растворителю поверхности остатков GrAtm в monomерном и димерном состояниях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пространственная структура и внутримолекулярная подвижность димера GrAtm

Влияние мембраноподобного окружения на взаимодействия спиралей в гомодимере GrAtm исследовано на примере двух сред, часто используемых в ЯМР-спектроскопии мембранных белков (рис. 1а,б): сферических мицеллах ДФХ и дискообразных липидных бицеллах ДМФХ/ДГФХ ($\rho \approx 0.3$) [4, 5]. Для исключения возможных разночтений, связанных с различными методиками сбора экспериментальных ЯМР-данных и расчета пространственной структуры, полученная ранее пространственная структура ТМ-фрагмента GrA₆₂₋₁₀₁ в мицеллах ДФХ [6] в данной работе не рассматривается.

Спектры кругового дихроизма для фрагмента GrAtm, встроенного как в мицеллы ДФХ или бицеллы ДМФХ/ДГФХ, так и в однослойные липосомы ДМФХ (фосфолипидный бислой), оказались практически идентичными и соответствовали $75 \pm 8\%$ содержанию α -спирали. Параметры ЯМР-релаксации ^{15}N -ядер основной цепи GrAtm: $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ NOE, времена T_1 и T_2 , а также рассчитанные эффективные локальные времена вращательной корреляции τ_R векторов ^{15}N -H (рис. 2) доказывают наличие стабильного ТМ-сегмента E⁷⁰-R⁹⁶, фланкируемого гибкими N- и C-концевыми участками. Время корреляции вращения комплекса пептид/мицелла или бицелла как целого, оцененное из отношения T_1/T_2 на ТМ-участке, составляет ~ 13 и ~ 16 нс, что, согласно эмпирической зависимости [26], соответствует димеру GrAtm, образующему комплекс с ~ 65 молекулами детергента (~ 34 кДа) или ~ 70 молекулами липида (~ 43 кДа). При этом, согласно данным динамического светорассеяния, обе супрамолекулярные системы имеют сходный гидродинамический радиус $26 \pm 4 \text{ \AA}$.

Чтобы получить информацию о взаимодействиях между спиралью GrAtm, использовали спектр ЯМР, накопленный для «изотопно-гетеродимерного» образца (рис. 1в). В этом спектре представлены

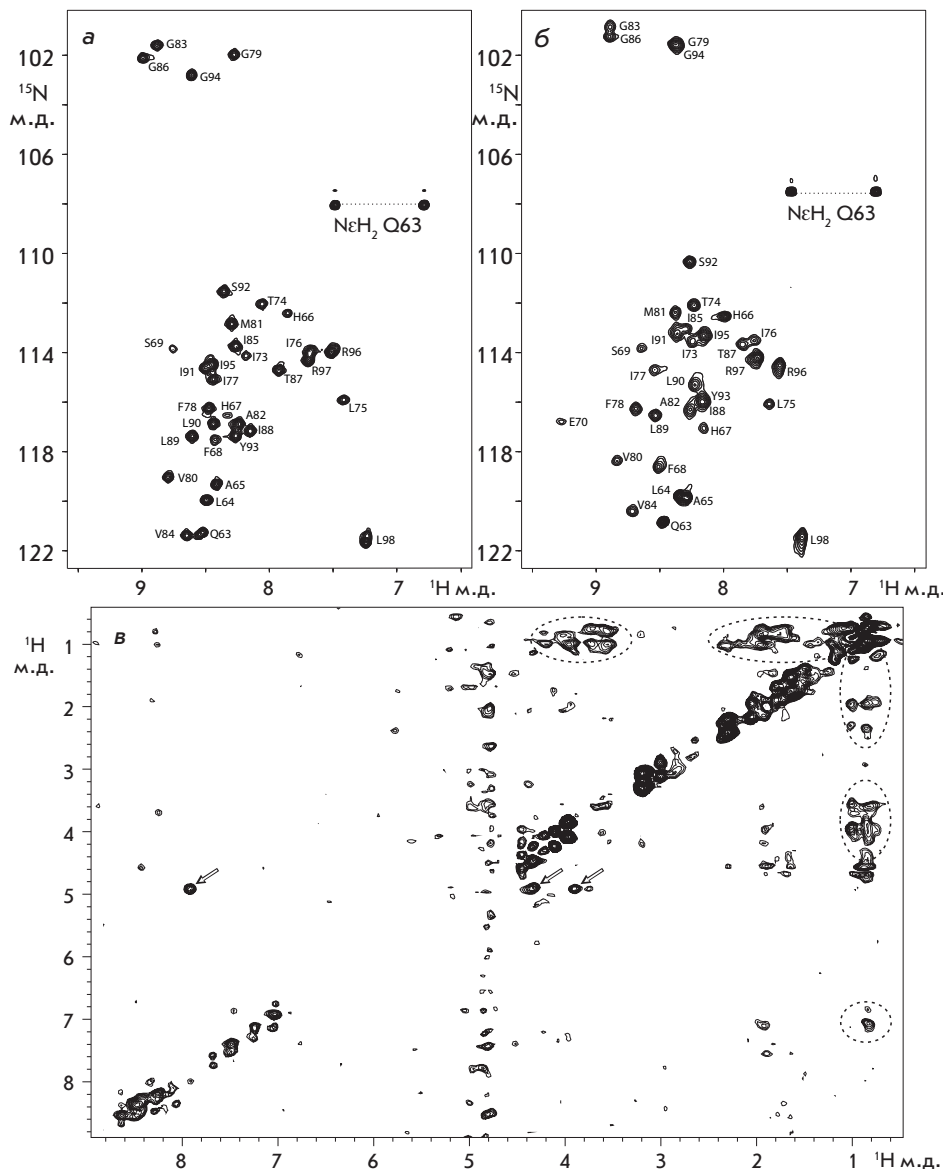


Рис. 1. Гетероядерные ЯМР-спектры $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC GrA tm в водной суспензии мицелл ДФХ (а) и бицелл ДМФХ/ДГФХ (б) с молярным отношением пептид/детергент и пептид/липид 1 : 35, рН 5, 40°C. Приведено отнесение сигналов. в – ^1H - ^1H -проекция 3D $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -F1-filtered/F3-edited-NOESY-спектра с межмономерными контактами ЯЭО для «изотопно-гетеродимерного» образца GrA tm в мицеллах ДФХ. Наблюдаемые в спектре кросс-пики соответствуют отфильтрованным межмономерным протон-протонным контактам ЯЭО. Пунктирными овалами обозначены области с межмономерными контактами ЯЭО между метильными и остальными группами остатков димера GrA tm. Стрелками указаны неотфильтрованные внутримномерные контакты ЯЭО с участием гидроксильной группы ОуН остатка Т⁸⁷. Эти контакты свидетельствуют о том, что в основной конформации ОуН-группа Т⁸⁷ образует внутримолекулярную связь с карбоксильной группой G⁸³.

кросс-пики ЯЭО, соответствующие переносу намагниченности от протонов, связанных с атомами ^{14}N и ^{12}C , на протоны, связанные атомами ^{15}N и ^{13}C [15]. В результате обнаружено 17 межмономерных ЯЭО-контактов в мицеллах и 14 в бицеллах. Наборы внутри- и межмономерных ЯЭО-контактов, идентифицированных в ЯМР-спектрах, показали, что в обеих средах GrA tm формирует симметричный в шкале времени ЯМР гомодимер, состоящий из двух параллельных спиралей. Следует отметить, что большинство различий в системах ЯЭО-контактов, наблюдаемых для GrA tm в мицеллах и бицеллах, можно объяснить изменениями химических сдвигов сигналов и связанными с этим различиями в перекрытиях кросс-пигов. Пространственные структуры

GrA tm определены с высоким качеством и разрешением (таблица, рис. 3а). Экспериментальные ЯМР-ограничения, использованные для расчета пространственных структур, и полученные координаты атомов для наборов структур димера GrA tm, встроенного в мицеллы ДФХ и бицеллы ДМФХ/ДГФХ, депонированы в международном банке данных пространственных структур RCSB (www.rcsb.org) с кодами доступа 2kre и 2krf соответственно. Репрезентативные структуры димера GrA tm подвергнуты энергетической МД-релаксации в явно заданной мицелле ДФХ и липидном бислое ДМФХ с наложенными экспериментальными ограничениями на расстояния. Это позволило адаптировать ЯМР-структуру к модельному мембранному окружению (рис. 3в) и про-

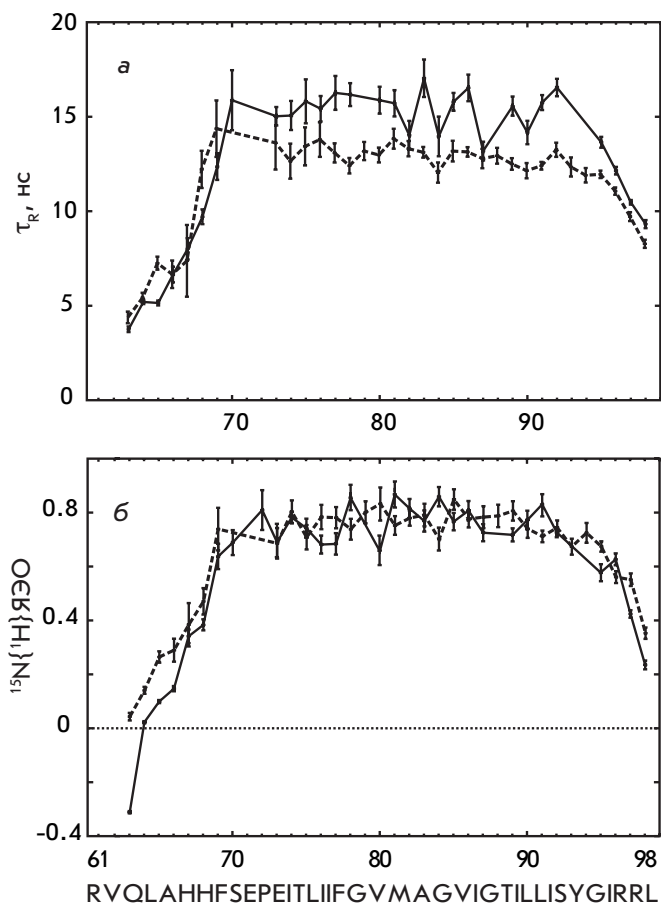


Рис. 2. ^{15}N -релаксационные параметры для амидных групп GrA в мицеллах ДФХ (пунктирная линия) и бицеллах ДМФХ/ДГФХ (сплошная линия). а – Значения эффективного времени корреляции броуновского вращения τ_R , рассчитанного из отношения времен T_1/T_2 ^{15}N -ядер соответствующих аминокислотных остатков; б – значения гетероядерного $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ ЯЭО.

верить используемые в МД-расчете силовые поля на соответствие результатам эксперимента. В обоих случаях продолжение МД-траектории без ограничений не вызвало существенных изменений структуры димера, что указывает как на его относительную стабильность, так и на приемлемость используемых силовых полей.

В целом, пространственная структура и внутри-молекулярная подвижность ТМ-домена GrA в мицеллах и бицеллах отличаются незначительно: в обоих случаях оси трансмембранных α -спиралей расположены под углом θ , равным -40° , а расстояние d между ними составило около 6.5 \AA . Вместе с тем сравнение пространственных структур димера (рис. 3а) показывает, что при переходе от мицелл

к бицеллам происходит небольшой изгиб на С-конце ТМ-спиралей. Периодический характер изменений химических сдвигов сигналов амидных протонов, $\Delta\delta_{\text{HN}}$, вдоль аминокислотной последовательности GrA при переходе от мицелл к бицеллам также указывает на небольшой изгиб на С-конце спиралей (рис. 3б). Тенденция изменения средних значений $\Delta\delta_{\text{HN}}$ от отрицательных к положительным вдоль ТМ-спирали указывает на возможное небольшое растяжение ее N-концевой части до интерфейса димеризации и сжатие после. Небольшой изгиб С-концов ТМ-спиралей, наряду с общим наклоном димера GrA по отношению к нормали липидного бислоя ДМФХ, также наблюдали в течение МД-релаксации (рис. 3в). Напротив, существенных искривлений ТМ-спиралей в димере GrA, встроенном в мицеллу ДФХ, не регистрировали ни в наборе рассчитанных структур, ни в течение МД-релаксации. Так как ацильные цепи в ДФХ короче (образованы 12 атомами углерода), чем в ДМФХ (14 углеродных атомов), то можно было бы ожидать более длинную ТМ-спираль (например, за счет частичного перехода α -спирали в спираль 3/10) в бицеллах по сравнению с мицеллами. Однако в полученном наборе ЯМР-структур димера GrA в мицеллах и бицеллах разница в длине α -спирального участка не обнаружена. И только во время МД-релаксации в явно заданной мицелле для первого витка ТМ-спирали GrA изредка наблюдали переходы спираль-изгиб (рис. 3в). Это согласуется с тем, что мицеллы являются более пластичными структурами, чем бицеллы, и в большей степени способны адаптироваться к форме и размерам ТМ-белка [27, 28]. В свою очередь, мицеллы по сравнению с бицеллами могут предоставлять большую свободу конформационной динамики для встроенного в них ТМ-белка. Действительно, во время МД-релаксации GrA без наложения ЯМР-ограничений параметры димера характеризовались в 2 раза большими амплитудами случайных флуктуаций в мицеллах ДФХ ($\theta 46 \pm 6^\circ$, $d 6.3 \pm 0.8 \text{ \AA}$), чем в бислое ДМФХ ($\theta 42 \pm 3^\circ$, $d 6.4 \pm 0.4 \text{ \AA}$), что указывает на более плотную упаковку ТМ-спиралей димера в липидном окружении. По-видимому, изменения в пространственной структуре димера GrA, наблюдаемые методом ЯМР в бицеллах по сравнению с мицеллами и в течение его МД-релаксации в липидном бислое, обусловлены адаптацией димера к бислою ДМФХ для предотвращения так называемого «гидрофобного несоответствия» [29, 30].

Поверхность димеризации GrA

Спирали GrA, встроенные в мицеллу ДФХ или в бицеллу ДМФХ/ДГФХ, ассоциируют в параллельный димер через так называемый тандемный

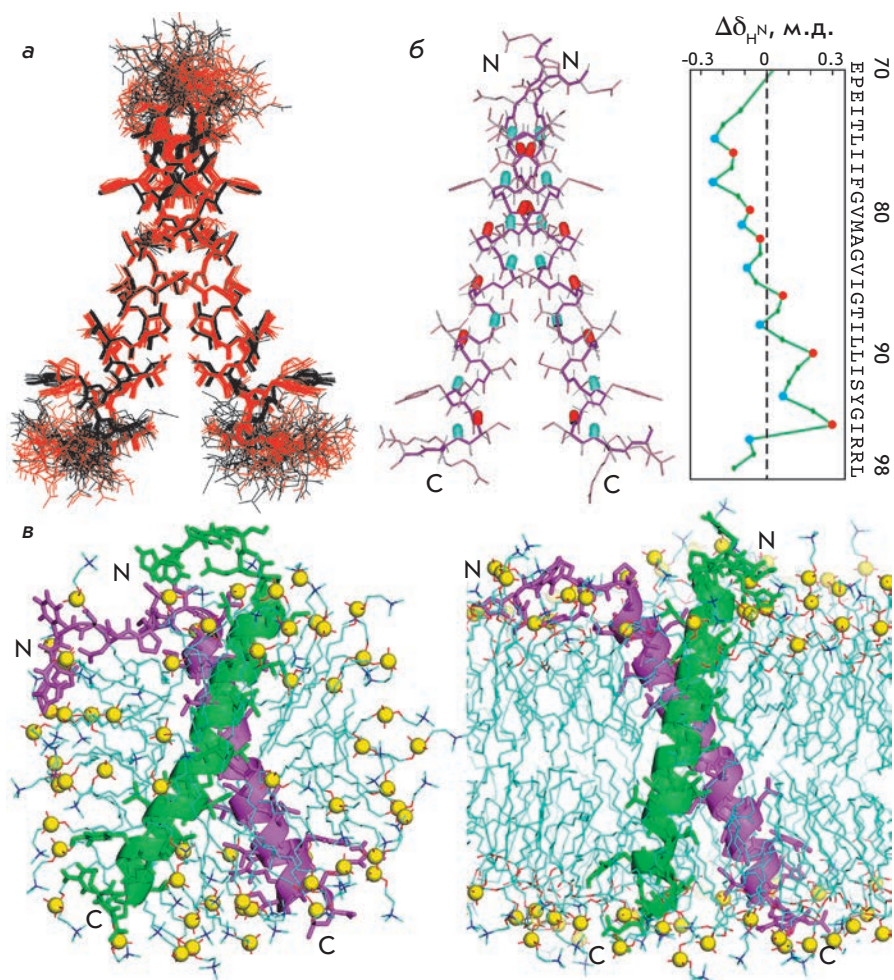


Рис. 3. а – Сравнение ЯМР-структур димера GrA tm в бицеллах ДМФХ/ДГФХ (показаны красным) и в мицеллах ДФХ (показаны черным). 20 структур в бицеллах и 20 структур в мицеллах совмещены по атомам основной цепи α-спирали E⁷²–I⁹⁵. Показаны только ковалентные связи с участием тяжелых атомов остатков (70–98). б – Справа показана разница (Δδ_{HN}) химических сдвигов сигналов протонов амидных групп GrA tm в бицеллах ДМФХ/ДГФХ и мицеллах ДФХ. Слева на структуре димера GrA tm в бицеллах голубым и красным выделены амидные группы остатков с локальными минимумами и максимумами значений Δδ_{HN} соответственно. Значение Δδ_{HN} сильно зависит от длины водородной связи, в которой участвует данный амидный протон, при этом локальное увеличение Δδ_{HN} указывает на укорочение водородной связи [37]. в – Структуры димера GrA tm после МД-релаксации в явно заданной мицелле ДФХ (слева) и бислое ДМФХ (справа). Желтыми сферами показаны атомы фосфора молекул детергентов и липидов. Ацильные цепи липидов и детергентов показаны голубыми линиями. Для наглядности разные мономеры окрашены в зеленый и лиловый цвета.

«четырёхчленный» мотив GG4 [31] G⁷⁹VxxG⁸³VxxT⁸⁷, также известный как «глициновая застёжка» [32]. Мотив образован остатками с малой боковой цепью, что дает возможность получить плотную правозакрученную упаковку ТМ-спиралей GrA tm, контактирующих слабополярными поверхностями (рис. 4а,б) в гидрофобном окружении. В то же время предсказанный ранее методом молекулярного моделирования [33] альтернативный «семичленный» мотив LI⁷⁶xxG⁷⁹xxAG⁸³xxG⁸⁶xxLL⁹⁰xxY⁹³ с левозакрученной упаковкой ТМ α-спиралей не задействован.

В обеих средах на интерфейсе димеризации GrA tm имеются восемь полярных межмолекулярных взаимодействий типа Сα–Н…О. Эти взаимодействия, которые можно охарактеризовать как неканонические водородные связи (с соответствующим расстоянием d(O, H) < 3 Å и углом СОН > 120° [34]), образуются между СαН G⁷⁹, G⁸³, V⁸⁰ и V⁸⁴ и карбонильными группами I⁷⁶, G⁷⁹ и V⁸⁰, а также ОγН-группой T⁸⁷ соответственно (рис. 4в). Квантово-химические расчеты показали, что при-

сутствие взаимодействий такого типа должно приводить к существенному изменению химических сдвигов сигналов протонов СαН-групп белков [35]. То есть химические сдвиги сигналов протонов СαН являются очень чувствительным сенсором расстояний до карбонильных групп на интерфейсе димеризации α-спиралей. Химические сдвиги протонов СαН G⁷⁹, G⁸³, V⁸⁰ и V⁸⁴ практически полностью совпадают в мицеллах и бицеллах (максимальное отличие – 0.05 м.д.), что демонстрирует высокую степень идентичности структурной организации интерфейса димеризации GrA tm в двух средах. Другими словами, не только общая топология, но и структурные детали интерфейса димеризации GrA tm идентичны в обеих мембраноподобных средах.

Сравнение полученных и ранее опубликованных структур GrA tm

Структуры, полученные в рамках нашей работы, хорошо согласуются с опубликованными данными по мутагенезу [31]. С другой стороны, структура

Структурная статистика для репрезентативных наборов из 20 ЯМР-структур димера GrAtm, встроенного в мицеллы ДФХ и бицеллы ДМФХ/ДФХ

ЯМР-структура димера GrAtm	Мицеллы	Бицеллы
PDB-код	2kre	2kpf
ЯМР-данные для расчета структуры		
Общее количество ограничений ЯЭО	484	520
внутриостаточные	234	278
межостаточные	216	214
последовательные ($ i-j =1$)	128	128
средней дальности ($1 < i-j \leq 4$)	88	86
дальние ($ i-j > 4$)	0	0
межмономерные	34	28
Ограничения на водородные связи внутримономерные (верхние/нижние)	108/108	108/108
межмономерные (верхние/нижние)	0/0	0/0
Ограничения на двугранные углы	156	156
угол ϕ основной цепи	56	56
угол ψ основной цепи	56	56
угол χ^1 боковой цепи	44	44
Качество расчета структуры		
Штрафная функция (\AA^2)	0.75±0.15	1.02±0.16
Нарушения ограничений		
на расстояния ($>0.2 \text{\AA}$)	0	0
на расстояния ($>0.1 \text{\AA}$)	6	5
на двугранные углы ($>5^\circ$)	0	0
Попарное СКО между структурами (\AA)		
ТМ α -спираль (72–95) ₂		
по атомам основной цепи	0.39±0.17	0.42±0.13
по всем тяжелым атомам	0.94±0.18	1.07±0.15
обобщенное СКО		
по атомам основной цепи	0.72±0.45	
по всем тяжелым атомам	1.25±0.37	
по атомам основной цепи между усредненными структурами	1.03	
Анализ карты Рамачандрана, % остатков (70–98) ₂		
в благоприятных регионах	92.7	90.4
в дополнительных разрешенных регионах	7.7	6.4
в принципиально разрешенных регионах	1.4*	0.2*
в запрещенных регионах	0.4*	0.7*
Упаковка ТМ-спиралей		
площадь межспиральных контактов (\AA^2)	370±20	380±20
угол θ (град) между осями ТМ-спиралей	-40±2	-40±2
расстояние d (\AA) между осями ТМ-спиралей	6.7±0.4	6.4±0.4

*Остатки из подвижных и неструктурированных участков GrAtm.

GrAtm как в мицелле, так и в бицелле оказалась близкой (СКО ~ 1.1 \AA по координатам атомов основной цепи остатков (72–95)₂) к ранее опубликованной структуре ТМ-фрагмента GrA₆₂₋₁₀₁, встроенного в мицеллу ДФХ [6]. Позднее на основе структурных ограничений, полученных методами ЯМР твердого тела, была предложена конформация димерного

ТМ-фрагмента GrA₇₀₋₉₈ в высушенных липидных бислоях из ДМФХ и пальмитоилолеилфосфатидилолина (ПОФХ) [7, 8]. Помимо небольшого уменьшения угла между осями ТМ-спиралей до -35° и относительного их поворота в димере на $\sim 25^\circ$, главным отличием от структуры в мицелле ДФХ является характер водородной связи, образуемой боковой це-

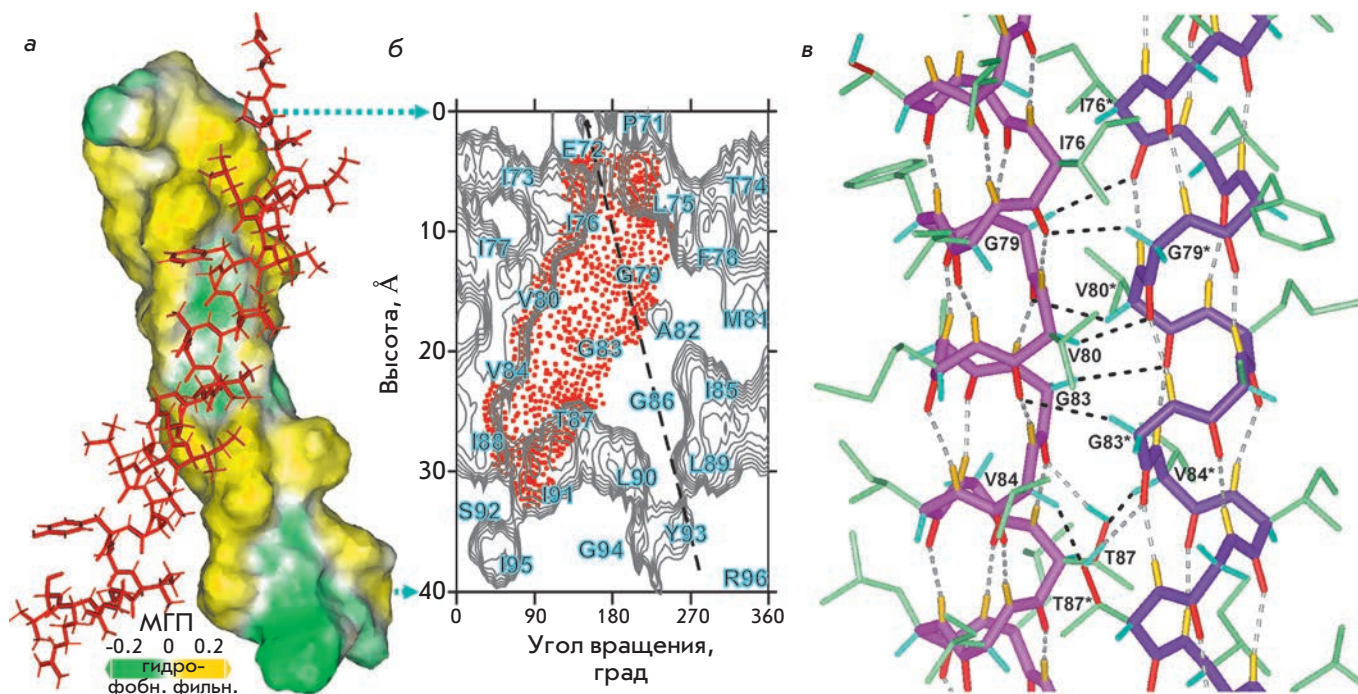


Рис. 4. а – Поверхность ТМ α -спирали правозакрученного димера GrA_{tm}, раскрашенная соответственно значениям молекулярного гидрофобного потенциала (МГП): желтым – гидрофобные, зеленым – гидрофильные участки. Второй мономер димера показан красным цветом. б – Карта поверхности ТМ α -спирали GrA_{tm} с изолиниями, соответствующими (гидрофобным) положительным значениям молекулярного гидрофобного потенциала (детали построения карты описаны в [21]). Красными точками отмечена область межмолекулярного контакта α -спиралей GrA_{tm}. Как видно из рисунка, контакт обеспечивается «четырёхчленным» GG4-подобным мотивом $G^{79}VxxG^{83}VxxT^{87}$. «Семичленный» мотив $L^{176}xxG^{79}xxAG^{83}xxG^{86}xxLL^{90}xxY^{93}$, предполагающий левозакрученную упаковку α -спиралей (отмечен штриховой линией), не задействован. в – Центральная часть интерфейса димеризации GrA_{tm} в бицеллах. Серым и черным пунктиром показаны внутримонмерные и неканонические $\alpha-N\cdots O$ межмономерные водородные связи соответственно.

пью T⁸⁷. На основании сближенности O_уH-группы треонина с карбонильной группой V⁸⁴ противоположной спирали авторы работы [8] сделали вывод о межмолекулярном характере этой связи. Согласно полученным в настоящей работе структурам димера GrA_{tm}, встроенного в мицеллы и бицеллы, атомы кислорода гидроксильной и карбонильной групп остатков T⁸⁷ и V⁸⁴ из соседних мономеров находятся на расстоянии ~4 Å, при этом в бицеллах эти атомы сближены до ~3.8 Å, что в принципе позволяет этим группам образовывать межмолекулярную водородную связь. Однако система контактов ЯЭО, наблюдаемая в спектрах ЯМР, измеренных как в бицеллах, так и в мицеллах (рис. 1в), однозначно свидетельствует о том, что в основной конформации GrA_{tm} O_уH-группа T⁸⁷ образует внутримолекулярную связь с карбонильной группой G⁸³ (сближены до ~2 Å) (рис. 4в). Тем не менее, во время МД-релаксации в обоих случаях детектировались несимметричные короткоживущие состояния

с межмолекулярной водородной связью между O_уH-группами T⁸⁷ (с поворотом угла χ^1 боковой цепи T⁸⁷ из *gauche+* в *gauche-* положение). Подобное явление было зарегистрировано и в других работах по моделированию димеризации ТМ-домена GrA [33, 36].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые для специфически взаимодействующих ТМ-спиралей проведено сравнительное исследование пространственной структуры и динамики в двух мембраноподобных средах разного вида. Это важный методический момент, позволяющий сделать вывод, что в случае ТМ-домена GrA общая топология димера, определяемая спецификой спираль-спирального взаимодействия, не зависит от выбора мембраноподобной среды и только локальная структура ТМ-спиралей в какой-то степени чувствительна к этому фактору. С другой стороны, известно, что дисковидная форма и липидный состав бицелл приближают их по физическим свойствам к при-

родной липидной мембране, в результате уменьшаются как конформационные флуктуации спиралей, так и флуктуации параметров, характеризующих их относительное расположение (угол θ и расстояние d между спиральями). В свою очередь, при прочих равных условиях это должно повышать стабильность пространственной структуры α -спирального мембранного белка в бицеллах по сравнению с мицеллами. ●

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, Федеральной целевой программой «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» и Программами Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Frishman D., Mewes H.-W. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 1999. V. 72. P. 1–17.
- Li E., Hristova K. // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 6241–6251.
- Zviling M., Kochva U., Arkin I.T. // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1768. P. 387–392.
- Bocharov E.V., Volynsky P.E., Pavlov K.V., Efremov R.G., Arseniev A.S. // Cell Adh. Migr. 2010. V. 4. P. 284–298.
- Kim H.J., Howell S.C., van Horn W.D., Jeon Y.H., Sanders C.R. // Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 2009. V. 55. P. 335–360.
- MacKenzie K.R., Prestegard J.H., Engelman D.M. // Science. 1997. V. 276. P. 131–133.
- Smith S.O., Song D., Shekar S., Groesbeek M., Ziliox M., Aimoto S. // Biochemistry. 2001. V. 40. P. 6553–6558.
- Smith S.O., Eilers M., Song D., Crocker E., Ying W., Groesbeek M., Metz G., Ziliox M., Aimoto S. // Biophys. J. 2002. V. 82. P. 2476–2486.
- Гончарук М.В., Шульга А.А., Ермолюк Я.С., Ткач Е.Н., Гончарук С.А., Пустовалова Ю.Е., Минеев К.С., Бочаров Э.В., Масленников И.В., Арсеньев А.С., Кирпичников М.П. // Мол. биол. 2011. Т. 45. № 5.
- Кирпичников М.П., Гончарук М.В., Ермолюк Я.С., Гончарук С.А., Шульга А.А., Масленников И.В., Арсеньев А.С. // Технол. живых систем. 2005. Т. 2. С. 20–27.
- Chakrabarti P., Khorana G. // Biochemistry. 1975. V. 14. P. 5021–5033.
- Sreerama N., Woody R.W. // Anal. Biochem. 2000. V. 287. P. 252–260.
- Keller R.L.J. The computer aided resonance assignment tutorial. Goldau, Switzerland: CANTINA Verlag, 2004. 81 p.
- Cavanagh J., Fairbrother W.J., Palmer A.G., Skelton N.J. Protein NMR spectroscopy: principles and practice. 2nd ed. San Diego, CA, USA: Acad. Press, 2007. 886 p.
- Zwahlen C., Legault P., Vincent S.J.F., Greenblatt J., Konrat R., Kay L.E. // Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. P. 6711–6721.
- Bocharov E.V., Korzhnev D.M., Blommers M.J., Arvinte T., Orekhov V.Y., Billeter M., Arseniev A.S. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 46273–46279.
- Güntert P. // Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 2003. V. 43. P. 105–125.
- Cornilescu G., Delaglio F., Bax A. // J. Biomol. NMR. 1999. V. 13. P. 289–302.
- Baker E.N., Hubbard R.E. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 1984. V. 44. P. 97–179.
- Lindahl E., Hess B., van der Spoel D. // J. Mol. Mod. 2001. V. 7. P. 306–317.
- Bocharov E.V., Mayzel M.L., Volynsky P.E., Mineev K.S., Tkach E.N., Ermolyuk Ya.S., Schulga A.A., Efremov R.G., Arseniev A.S. // Biophys. J. 2010. V. 98. P. 881–889.
- Koradi R., Billeter M., Wüthrich K.J. // Mol. Graphics. 1996. V. 14. P. 51–55.
- DeLano W.L. The PyMOL Molecular Graphics System, Palo Alto, CA, USA: DeLano Scientific, 2002.
- Efremov R.G., Gulyaev D.I., Vergoten G., Modyanov N.N. // J. Prot. Chem. 1992. V. 11. P. 665–675.
- Kabsch W., Sander C. // Biopolymers. 1983. V. 22. P. 2577–2637.
- Daragan V.A., Mayo K.H. // Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 1997. V. 31. P. 63–105.
- Bordag N., Keller S. // Chem. Phys. Lipids. 2010. V. 163. P. 1–26.
- Lind J., Nordin J., Mäler L. // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1778. P. 2526–2534.
- Nyholm T.K., Ozdirekcan S., Killian J.A. // Biochemistry. 2007. V. 46. P. 1457–1465.
- Sparr E., Ash W.L., Nazarov P.V., Rijkers D.T., Hemminga M.A., Tieleman D.P., Killian J.A. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 39324–39331.
- Mackenzie K.R. // Chem. Rev. 2006. V. 106. P. 1931–1977.
- Kim S., Jeon T.-J., Oberai A., Yang D., Schmidt J.J., Bowie J.U. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 14279–14283.
- Efremov R.G., Vereshaga Y.A., Volynsky P.E., Nolde D.E., Arseniev A.S. // J. Comput. Aided. Mol. Des. 2006. V. 20. P. 27–45.
- Senes A., Ubarretxena-Belandia I., Engelman D.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 9056–9061.
- Vargas R., Garza J., Dixon D.A., Hay B.P. // J. Am. Chem. Soc. 2000. V. 122. P. 4750–4755.
- Cuthbertson J.M., Bond P.J., Sansom M.S. // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 14298–14310.
- Wagner G., Pardi A., Wüthrich K. // J. Am. Chem. Soc. 1983. V. 105. P. 5948–5949.