

характеристика каждой кривой, например, среднее арифметическое всех значений $\langle K_\delta \rangle$. Однако, вследствие случайных флуктуаций экспериментальных точек рассеяние величин кривизны оказывается существенным, включая грубые выбросы. В этом случае предпочтительнее использовать робастную оценку центра всех значений – медиану.

Оценка критерия $\langle K_\delta \rangle$ определяется динамикой агрегации молекул в растворе, а также случайными флуктуациям в ограниченной экспериментальной выборке, влияние которых в оптимальных условиях должно минимизироваться. На рис.3 видно, что средняя кривизна для молекул NOG, FMN, CAF, NMD существенно отличается от остальной группы веществ. Равновесные константы взаимодействия для 3-х из этих веществ являются низкими. Однако попадание в эту группу NOG, вероятно, связано с неудовлетворительной стратегией эксперимента, т.е. с недостаточной освещенностью диапазона возможных значений δ .

Выводы.

В работе предложен интегральный количественный критерий формы экспериментальных кривых, позволяющий унифицировать и сжать размерность представления экспериментальных данных. Этот критерий можно использовать для сравнения экспериментальных кривых разных протонов одного соединения или разных веществ. На основании критерия $\langle K_\delta \rangle$ может быть выработано дискриминационное правило для определения области допустимых значений равновесной константы K нового вещества. Вследствие чувствительности критерия к случайным флуктуациям экспериментальных данных, критерий может быть потенциально использован для выработки оптимальной стратегии эксперимента, направленной на достоверное определение параметров агрегации.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект №15-33-20284).

Список литературы / References:

1. Evstigneev M.P. Hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution. *Int. Rev. Phys. Chem.*, 2014, vol. 33:2, pp. 229-273.
2. Markvoort A.J., ten Eikelder H.M.M., Hilbers P.A.J., de Greef T.F.A. Fragmentation and coagulation in supramolecular (co)polymerization kinetics. *ACS Cent. Sci.*, 2016, DOI: 10.1021/acscentsci.6b00009.

IN SILICO ПОИСК ДИМЕРНЫХ СОСТОЯНИЙ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА РЕЦЕПТОРА ИНСУЛИНА

Замалетдинов М.Ф.¹, Кузнецов А.С.¹, Ефремов Р.Г.^{1,2}

¹ ФГБУН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, ГСП-7, 117997, РФ

²Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики
ул. Мясницкая, 20, г. Москва, 101000, РФ
e-mail: miftakhz@gmail.com

Аннотация. Белки семейства рецептора инсулина относятся к классу рецепторных тирозинкиназ, который включает в себя три рецептора: рецептор инсулина (IR), рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R) и рецептор, подобный рецептору инсулина (IRR). Они являются важными объектами исследования, так как нарушения в их работе могут приводить к патологическим состояниям и отклонениям в развитии.

Изучение работы данных рецепторов затруднено из-за необходимости учета влияния мембранного окружения на их правильную организацию и функционирование. В настоящий момент не существует единой теории о механизме активации тирозинкиназ этого семейства, но было показано, что важную роль играет процесс димеризации трансмембранного (ТМ) домена. В данной работе построили модели димеров ТМ-доменов рецепторов IR, IGF-1R, IRR и изучили их структурные характеристики методами компьютерного моделирования. Полученные модели могут быть использованы в будущем для исследования влияния мембранного окружения и точечных мутаций на димеризацию и, следовательно, на активность рецепторов.

Ключевые слова: рецептор инсулина, трансмембранный домен, молекулярная динамика, взаимодействие альфа-спиралей.

IN SILICO SEARCH FOR TRANSMEMBRANE DOMAIN DIMERIC STATES OF INSULIN RECEPTOR FAMILY PROTEINS

Zamaletdinov M.F.¹, Kuznetsov A.S.¹, Efremov R.G.^{1,2}

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences
Miklukho-Maklaya Str., 16/10, Moscow, GSP-7, 117997, Russia

²National research university Higher school of economics
Myasnitskaya Str., 20, Moscow, 101000, Russia
e-mail: miftakhz@gmail.com

Abstract. Insulin receptor family refers to receptor tyrosine kinases and consists of three proteins: insulin receptor (IR), type-1 insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) and insulin receptor-related receptor (IRR). These proteins are important research objects due to interruptions of normal signaling may result to pathological conditions and developmental disabilities.

Studies of these receptors activation dynamics is difficult due to necessary consideration of membrane environment for their correct organization and functioning. Nowadays there is no global theory about the activation mechanism of this family tyrosine kinases but importance of transmembrane (TM) domain dimerization in activation process was suggested. In this study we elaborated molecular models of TM domain dimers of IR, IGF-1R, IRR, and structural properties of these models were analyzed in silico. The resulting models can be used for study the role of membrane environment and point mutations on dimers stability and therefore receptor's activity.

Key words: insulin receptor, transmembrane domain, molecular dynamics, alpha-helices interaction.

В подсемейство инсулинового рецептора входят три представителя:

- Рецептор инсулина (IR), отвечающий за регуляцию гомеостаза и участвующий в метаболизме углеводов;
- Рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R), регулирующий процессы роста, развития и дифференцировки клеток и тканей организма;
- Рецептор, подобный рецептору инсулина (IRR), являющийся сенсором слабощелочной среды и участвующий в поддержании кислотно-щелочного баланса в организме.

Нарушения в работе данных рецепторов непосредственно связаны с развитием таких болезней как диабет второго типа [1], рак [2] и болезнь Альцгеймера [3].

Структура данных рецепторов представляет собой $(\alpha\beta)_2$ тетрамер, в котором α -субъединицы соединены с β -субъединицами дисульфидными связями. Гетеродимеры ($\alpha\beta$), в свою очередь, связаны между собой двумя-четырьмя дисульфидными мостиками между α -субъединицами.

Внеклеточная часть рецептора представляет собой димер, по форме напоминающий букву "Λ" (далее обозначается как "открытая" форма) [4]. Начиная с N-конца, мономер α -субъединицы внеклеточной части состоит из двух лейцин-насыщенных доменов (L1 и L2), разделенных цистеин-богатым доменом (CR), за которыми расположены три фибронектин-III-подобных домена (FnIII-1, FnIII-2, FnIII-3). На C-конце α -субъединицы находится так называемый вставочный домен (ID- α). Субъединица β , помимо внеклеточной части, включает в себя α -спиральный трансмембранный (TM), внутриклеточный примембранный (JM), тирозинкиназный (TK) и C-концевой (CT) домены (см. рис. 1А).

Считается, что активация внеклеточного домена вызывает конформационные изменения, приводящие к уменьшению расстояния между β -субъединицами, что провоцирует спонтанную димеризацию [5] и фосфорилирование тирозинкиназных доменов, запускающее сложный каскад биохимических реакций.

Поведение TM-домена в ходе активации рецепторов семейства рецептора инсулина до сих пор не изучено. В нескольких работах, однако, показано, что он является важным участником данного процесса. В двух работах, представленных в 2014 году, предполагаются две различные модели активации рецепторов с участием TM-домена [8, 9].

В работе [8] наблюдали активацию рецептора инсулина искусственным пептидом, соответствующим его TM-домену (IR-TM) в отсутствие инсулина. На основе результатов данного исследования была предложена модель активации, в которой TM-домен димеризован в неактивном состоянии рецептора, а при связывании лиганда происходят конформационные изменения во внеклеточной части, которые приводят к диссоциации мономеров TM-домена в пространстве, вызывая сближение тирозинкиназных доменов и их автофосфорилирование. При встраивании IR-TM в мембрану он разрушает TM-димер, что также приводит к активации. Данная модель активации схематично представлена на рисунке 1Б.

В [9] на основе пространственных структур внеклеточного домена, структура которых получена рентгеноструктурным анализом [4, 10], была предложена модель активации рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (см. рис. 1В), предполагающая, что связь между L1-доменом одной α -субъединицы и доменами FnIII-2' FnIII-3' второй удерживает димер внеклеточной части рецептора в "открытом" состоянии. Предположение о димеризации TM-домена, было экспериментально подтверждено исследованиями димеризации изолированных TM-доменов в клеточной мембране методами резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). Оценка степени фосфорилирования вариантов IGF-1R без внеклеточного домена и с длинным линкером между примембранной областью внеклеточной части рецептора и TM-доменом показала, что эти формы рецептора также склонны к спонтанной активации без лиганда.

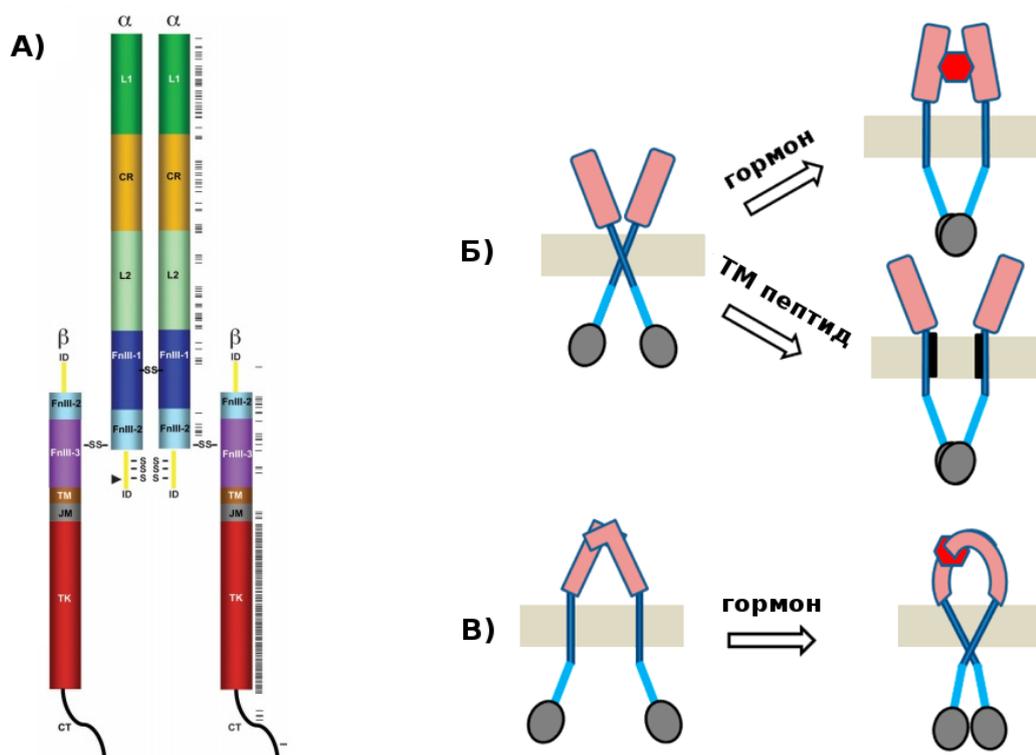


Рисунок 1 – Рецептор инсулина. А) доменная структура рецептора, штрихами указаны остатки, консервативные для всего семейства [6]. Б-В) Две предложенные в литературе схемы активации [7]

Так как экспериментальное исследование структурных и динамических параметров ТМ-доменов мембранных белков затруднено, перспективными оказываются методы компьютерного моделирования, которые и используются в данной работе. Целью настоящей работы является поиск возможных стабильных димерных состояний ТМ-доменов рецепторов IR, IGF-1R и IRR. В рамках этого исследования проводили поиск возможных конформаций димеров ТМ-доменов тирозинкиназ семейства инсулинового рецептора и осуществляли их сравнительный анализ. Были поставлены следующие задачи:

- Построить предварительные структурные модели димера ТМ-домена на основании сопоставления гидрофобных свойств молекулярных поверхностей α -спиралей (алгоритм PREDDIMER). [11]
- Изучить структурно-динамические параметры моделей в гидратированном липидном бислое методом молекулярной динамики, отобрать наиболее стабильные конформации, выявить взаимодействия, играющие важную роль в образовании комплекса спираль-спираль в мембране.
- Для наиболее стабильных структур методом интегрирования средней силы рассчитать профили свободной энергии димеризации в зависимости от расстояния между мономерами.

Для первичного предсказания структуры альфа-спирального участка рецепторов IR, IGF-1R и IRR, использовали веб-сервер PREDDIMER [11]. Использовали последовательности аминокислот, включающие в себя ТМ-домен, из базы данных последовательностей белков UniProt (INSR_HUMAN, IGF1R_HUMAN, INSR_HUMAN). Достоверность результатов достигалась путем старта с различными входными данными: для каждого рецептора использовали по 6 стартовых вариантов последовательностей, отличающихся друг от друга на несколько концевых аминокислотных остатков. Для полученных структур рассчитывали угол скрещивания спиралей и определяли интерфейс взаимодействия. На основании сравнения этих параметров структуры группировали в кластеры, из которых отбирали по одной представительной структуре для дальнейших исследований.

Ко всем отобраным на предыдущем шаге структурам были добавлены концевые аминокислотные остатки (в идеальной α -спиральной конформации) для уравнивания длины последовательности моделей и поддержания их правильной ориентации в бислое. Далее, полученные структуры были помещены в центр заранее уравновешенного бислоя из молекул пальмитоилолеилфосфатидилхолина (ПОФХ). Все пересекающиеся с белком молекулы липидов были удалены. Также в систему добавляли молекулы воды и ионы для нейтрализации электрического заряда. Производили минимизацию энергии, чтобы добиться устранения неблагоприятных взаимодействий между атомами, вызванных грубой сборкой системы. Для расчетов молекулярной динамики (МД) использовали программный пакет GROMACS версии 4.5.6 [12]. Дальнейшую релаксацию окружения проводили при фиксированном положении атомов основной цепи белка, чтобы молекулы липидов и воды «подстроились» под структуру димера. Затем рассчитывали траекторию МД длительностью 50 нс при постоянном давлении и температуре 315 К.

Ни в одном случае димеры не диссоциировали за время МД, однако для некоторых из них наблюдали изменение конформации. Для оценки произошедших изменений проводили анализ следующих параметров:

- Среднеквадратичное отклонение (СКО) координат атомов основной цепи пептида относительно начального положения.
- Эволюция вторичной структуры во времени.
- Интерфейс взаимодействия мономеров.
- Наличие характерных водородных связей между мономерами.

В результате были отобраны наиболее стабильные по совокупности этих параметров модели димера: по три для рецептора инсулина и рецептора, схожего с рецептором инсулина, и четыре - для рецептора инсулиноподобного фактора роста.

Свободную энергию димеризации ТМ-спиралей оценивали методом расчета потенциала средней силы (PMF). Составляли набор промежуточных состояний для различных расстояний между мономерами (32 независимых старта, от 7,0 до 22,5 Å с шагом 0,5 Å), для которых проводили расчет траекторий МД и вычисляли среднюю силу взаимодействия мономеров. Начальные состояния системы получали с помощью релаксации структуры димера длительностью 50 нс, в ходе которой мономеры удерживали на требуемом расстоянии за счет использования гармонического потенциала. Применяли метод “зонтичной” выборки с силовой постоянной 1000 кДж/(моль·Å). Далее рассчитывали траекторию МД длительностью 50 нс. Свободная энергия ассоциации димеров была оценена путем интегрирования равнодействующей силы вдоль расстояния между мономерами. Чтобы оценить погрешность вычисления PMF, траектории МД делили на 4 равные части, которые использовали для независимого вычисления соответствующих профилей.

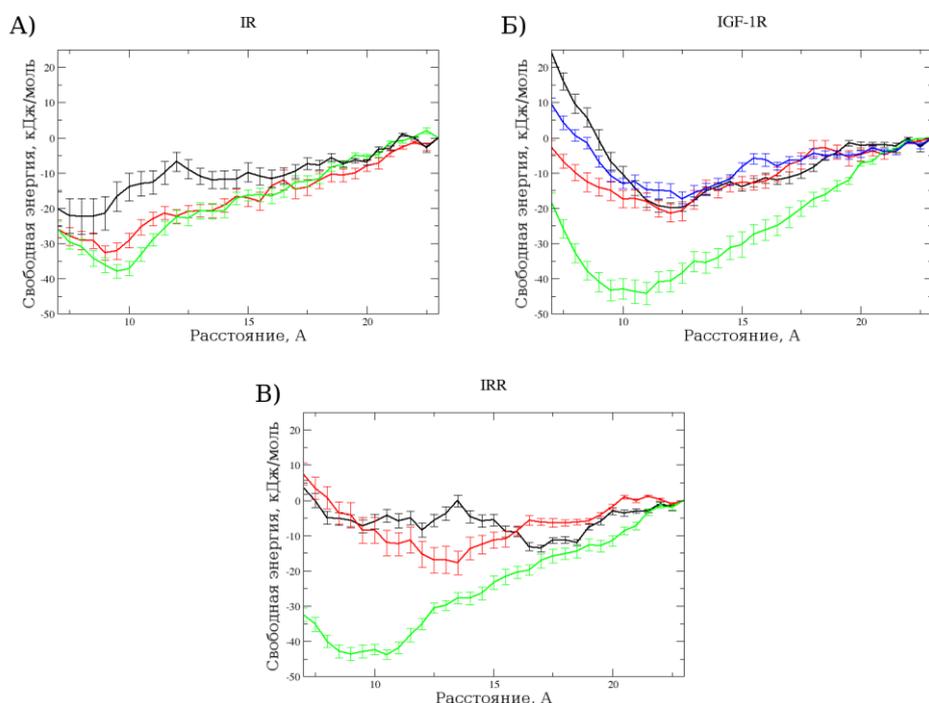


Рисунок 2 – Профили свободной энергии димеризации А) IR, Б) IGF-1R, В) IRR. Различными цветами указаны разные модели димеров данных рецепторов. Погрешности оценивали путем независимого расчета профилей для пяти неперекрывающихся частей траектории

В результате были получены две энергетически выгодные модели рецептора инсулина (см. рис. 2А), которые представляют собой близкие состояния димера, различающиеся лишь конформацией N-концевого фрагмента, среднеквадратичное отклонение координат атомов основной цепи С-концевого фрагмента данных моделей не превышает 0,7 Å. Таким образом, можно считать, что данные модели соответствуют одному состоянию рецептора с малым отрицательным углом скрещивания.

Для ТМ-домена рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 и рецептора, подобного рецептору инсулина, было получено по одной стабильной и энергетически выгодной структуре (см. рис. 2Б, 2В), из чего можно предполагать, что у каждого рецептора семейства существует одно состояние димера ТМ-домена. Данное утверждение согласуется с современными представлениями о том, что димерное состояние ТМ-домена рецепторов данного семейства должно быть единственным (см. рис. 1Б, 1В) [7]. Наши результаты демонстрируют, что три рецептора одного класса реализуют сходные по геометрическим параметрам конформации димеров, несмотря на низкую степень гомологии их ТМ-доменов (максимальная степень гомологии составляет 21 %). При этом у всех димеров интерфейс взаимодействия сформирован алифатическими и малыми полярными аминокислотными остатками. Оценки свободной энергии ассоциации для всех рассмотренных рецепторов также дают близкие значения. Можно предположить, что данные белки

функционируют по одинаковому механизму, при этом мы предполагаем, что димеризованное состояние соответствует активной форме рецептора, в которой киназные домены сближены в пространстве, в пользу чего также говорят данные FRET-исследований, приведенные в работе [9]. Можно предположить следующий механизм активации: в неактивном состоянии ТМ-домены не взаимодействуют, а при активации рецептора, после изменения конформации внеклеточного домена, происходит их спонтанная димеризация, что не противоречит большинству литературных данных.

Данные модели могут быть использованы в будущем для исследования влияния мембранного окружения и точечных мутаций на устойчивость димера и, следовательно, на активность рецепторов.

Список литературы / References:

1. Saltiel A.R., Kahn C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, vol. 414, no. 6865, pp. 799-806.
2. Frasca F., Pandini G., Sciacca L., Pezzino V., Squatrito S., Belfiore A., Vigneri R. The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases. *Arch. Physiol. Biochem.*, vol. 114, no. 1, pp. 23-37.
3. Schiöth H.B., Craft S., Brooks S.J., Frey W.H., Benedict C. Brain insulin signaling and Alzheimer's disease: current evidence and future directions. *Mol. Neurobiol.*, vol. 46, no. 1, pp. 4-10.
4. Smith B.J., Huang K., Kong G., Chan S.J., Nakagawa S., Menting J.G., Hu S.-Q., Whittaker J., Steiner D.F., Katsoyannis P.G., Ward C.W., Weiss M.A., Lawrence M.C. Structural resolution of a tandem hormone-binding element in the insulin receptor and its implications for design of peptide agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 107, no. 15, pp. 6771-6776.
5. Cabail M.Z., Li S., Lemmon E., Bowen M.E., Hubbard S.R., Miller W.T. The insulin and IGF1 receptor kinase domains are functional dimers in the activated state. *Nat. Commun.*, 2015, vol. 6, pp. 6406.
6. Hernández-Sánchez C., Mansilla A., de Pablo F., Zardoya R. Evolution of the Insulin Receptor Family and Receptor Isoform Expression in Vertebrates. *Mol. Biol. Evol.*, 2008, vol. 25, no. 6, pp. 1043-1053.
7. Tatulian S.A. Structural Dynamics of Insulin Receptor and Transmembrane Signaling. *Biochemistry*, 2015, vol. 54, no. 36, pp. 5523-5532.
8. Lee J., Miyazaki M., Romeo G.R., Shoelson S.E. Insulin Receptor Activation with Transmembrane Domain Ligands. *J. Biol. Chem.*, 2014, vol. 289, no. 28, pp. 19769-19777.
9. Kavran J.M., McCabe J.M., Byrne P.O., Connacher M.K., Wang Z., Ramek A., Sarabipour S., Shan Y., Shaw D.E., Hristova K., Cole P.A., Leahy D.J. How IGF-1 activates its receptor. *eLife*, 2014, vol. 3.
10. Menting J.G., Whittaker J., Margetts M.B., Whittaker L.J., Kong G.K.-W., Smith B.J., Watson C.J., Žáková L., Kletvíková E., Jiráček J., Chan S.J., Steiner D.F., Dodson G.G., Brzozowski A.M., Weiss M.A., Ward C.W., Lawrence M.C. How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. *Nature*, 2013, vol. 493, no. 7431, pp. 241-245.
11. Polyansky A.A., Chugunov A.O., Volynsky P.E., Krylov N.A., Nolde D.E., Efremov R.G. PREDDIMER: a web server for prediction of transmembrane helical dimers. *Bioinformatics*, 2014, vol. 30, no. 6, pp. 889-890.
12. Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A.E., Berendsen H.J.C. GROMACS: fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.*, 2005, vol. 26, no. 16, pp. 1701-1718.

О СТРУКТУРНОЙ САМООРГАНИЗАЦИИ C₆₀ ФУЛЛЕРЕНА И ЦИСПЛАТИНА В ФИЗИОЛОГИЧЕСКОМ РАСТВОРЕ

Прилуцкий Ю.И.¹, Черепанов В.В.², Евстигнеев М.П.^{3,4}, Воронин Д.П.³,
Степкин В.И.², Риттер Ю.⁵

¹ Киевский национальный университет им. Т. Шевченко
ул. Владимирская, 64, г. Киев, 01601, Украина

² Институт физики НАН Украины
пр. Науки, 46, г. Киев, 03680, Украина

³ Севастопольский государственный университет
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ
e-mail: max_evstigneev@mail.ru

⁴ Белгородский государственный национальный исследовательский университет
пр. Победы, 85, г. Белгород, 308015, РФ

⁵ Технический университет Ильменау,
ул. Веймара, 25, г. Ильменау, 98693, Германия

Аннотация. Методами сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии впервые изучены особенности структурной самоорганизации C₆₀ фуллерена и антиопухолевого препарата цисплатина в физиологическом растворе (0.9% NaCl), что в дальнейшем может быть использовано для выяснения механизмов их специфической антиопухоловой активности и практического использования в онкологии.

Ключевые слова: C₆₀ фуллерен, цисплатин, физиологический раствор, сканирующая электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия.