

12. Davies D., Segal D. Protein crystallization: microtechniques involving vapor diffusion. *Methods Enzymol.*, 1971, vol. 22, pp. 266-269.
13. Hulme E.C., Trevethick M.A. Ligand binding assays at equilibrium: Validation and interpretation, *Br. J. Pharmacol.*, 2010, vol. 161, pp. 1219-1237.
14. Trott O., Olson A.J. Auto Dock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 2010, vol. 31, pp. 455-461.

### ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СРЕДЫ НА ДИМЕРИЗАЦИЮ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ ГЛИКОФОРИНА А В КОМПЬЮТЕРНОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Кузнецов А.С.<sup>1</sup>, Ефремов Р.Г.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики  
ул. Мясницкая, 20, г. Москва, 101000, РФ.  
e-mail: andrej.kuznecov@phystech.edu

**Аннотация.** Разработан комплексный подход к изучению взаимного влияния белка и мембранной среды в процессе димеризации трансмембранных (ТМ)  $\alpha$ -спиральных пептидов. В основе подхода – численное разложение профилей свободной энергии взаимодействия ТМ-спиралей на компоненты, соответствующие различным типам взаимодействий, и картирование пространственного распределения средней плотности липидов. Метод апробирован для ТМ-сегментов гликофорина А человека (GrA) и нескольких модельных пептидов. Показано, что липиды вносят значительный выгодный вклад в свободную энергию димеризации, в то время как образующиеся на интерфейсе мономеров контакты аминокислотных остатков могут, наоборот, быть невыгодными. Также на боковой поверхности ТМ-доменов GrA показано наличие сайтов связывания ацильных цепей молекул липидов. Таким образом, аминокислотная последовательность белка определяет и белок-белковые взаимодействия, и связывание липидов, что влияет на детальное распределение энергетических вкладов. При этом липидная мембрана может выступать в качестве непосредственного участника спонтанной ассоциации ТМ  $\alpha$ -спиралей. Результаты данной работы могут быть использованы для рационального конструирования перспективных пептидных модуляторов, направленных на корректировку работы битопных мембранных белков, включая рецепторные тирозинкиназы.

**Ключевые слова:** трансмембранные домены, энергия ассоциации, мембранные белки, гликофорин А

### IN SILICO ESTIMATION OF THE MEMBRANE EFFECT ON THE DIMERIZATION OF TRANSMEMBRANE DOMAINS OF GLYCOPHORIN A

Kuznetsov A.S.<sup>1</sup>, Efremov R.G.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences  
Miklukho-Maklaya Str., 16/10, Moscow, GSP-7, 117997, Russia,

<sup>2</sup> National Research University Higher School of Economics  
Myasnitskaya Str., 20, Moscow, 101000, Russia  
e-mail: andrej.kuznecov@phystech.edu

**Abstract.** Here we present a combined method to study mutual effects of a protein and a membrane upon the dimerization of transmembrane (TM)  $\alpha$ -helical peptides. The approach is based on the numerical decomposition of dimerization free energy profiles for TM helices into components corresponding to different interaction types and on the mapping of the distribution of the average lipid density around the protein. The method was tested on the TM domains of human glycoporphin A (GrA) and several model peptides. It is shown that lipids contribute significantly to a total free energy of dimerization, and the direct protein-protein contacts may be unfavorable. Also, we found some lipid acyl chains binding sides on the surface of TM domains of GrA. Thus, the amino acid sequence determines not only the protein-protein contacts during dimerization, but also the interactions with lipids, and that can determine the detailed balance between the free energy contributions. Lipid membrane can act as an active driving force in the process of TM helices association. The look rather promising for further rational design of peptide modulators aimed to interact with bitopic membrane proteins, including receptor tyrosine kinases.

**Key words:** transmembrane domains, dimerization energy, membrane proteins, glycoporphin A

Мембрана живой клетки имеет сложную структуру и включает в себя не только липиды, но и множество различных белков, олигосахариды и связанные молекулы воды и ионы. Все эти компоненты работают как единый сложный механизм, внутри которого существует множество связей. Одна из ключевых его функций – передача поступающих извне сигналов внутрь клетки. Некоторые сигналы (например, свет или гидрофобные молекулы) способны преодолеть этот барьер самостоятельно, тогда как для других мембрана непроницаема [1]. Для них на поверхности клетки существует большой набор мембранных белков (МБ), выполняющих роль проводников информации или вещества сквозь эту границу. Около четверти всех производимых живой клеткой белков являются мембранными [2]. МБ ответственны за поток веществ и информации через клеточную мембрану, поэтому нарушения в их функционировании приводят к паталогическим состояниям, и все они являются потенциальными мишенями для фармакологических средств [3, 4]. Наиболее важную роль в работе МБ, как

правило, выполняет трансмембранный (ТМ) домен, являющийся непосредственным проводником внешнего воздействия через мембрану [5, 6]. Понимание механизмов его функционирования необходимо для селективного воздействия на эти системы с помощью новых фармакологических агентов, например, пептидов-“перехватчиков” [4]. Одной из главных мишеней для них, несомненно, являются рецепторные тирозинкиназы, отвечающие за регулирование жизненного цикла клетки и в большинстве своём реагирующие на присутствие во внеклеточном пространстве гормонов. Поэтому нарушения в их работе приводят к тяжёлым патологиям [5, 6]. Формирование пространственной структуры ТМ-доменов МБ и передача сигнала определяются взаимодействиями ТМ  $\alpha$ -спиралей в мембране [7]. Этот процесс включает в себя в том числе и взаимодействие с мембранной средой.

Несмотря на значительный прогресс в изучении ТМ-доменов МБ и их взаимодействий в мембране, ряд вопросов ещё остаются открытыми. В частности, мало известно о роли мембраны и её участии в межбелковых взаимодействиях. Показано, что различные параметры липидного бислоя могут модулировать степень димеризации ряда МБ [8-10], однако детальный механизм этого процесса неизвестен. Настоящая работа посвящена исследованию взаимного влияния белка и мембранной среды в процессе димеризации ТМ-доменов гликофорина А (GrA) с помощью компьютерного моделирования. Основные задачи включали в себя количественную оценку свободной энергии димеризации GrA дикого типа, двух мутантных форм G83A и T87V, а также двух модельных пептидов: полиаланина (PolyALA) и полилейцина (PolyLEU). Также проводили выделение энергетических вкладов белок-белковых взаимодействий и взаимодействий белка со средой. Для получения информации о влиянии белка на свойства мембраны оценивали гетерогенность пространственного распределения плотности липидов.

Для расчёта траекторий молекулярной динамики (МД) использовали программный пакет Gromacs версии 4.6.7 и набор параметров силового поля Gromos 43a2 для описания белка [11], для липидов – модифицированную версию параметров, предложенных Бергером [12]. Модель димера GrA строили на основании его пространственной структуры в бицеллах [13], мутантные формы – по гомологии, путём замены соответствующих остатков с последующей минимизацией энергии. Для PolyALA и PolyLEU стартовые структуры димеров были построены из пептидов в идеальной  $\alpha$ -спиральной конформации с геометрическими параметрами димера, близкими к таковым у GrA, при этом концевые остатки этих пептидов были аналогичны таковым у GrA для обеспечения их трансмембранной ориентации. Затем эти модели помещали в центр гидратированного липидного бислоя, содержащего 128 молекул пальмитоилолеилфосфатидилхолина (ПОФХ), удаляли из системы молекулы липидов и воды, пересекающиеся с белком. Проводили минимизацию энергии и релаксацию липидного окружения в МД с зафиксированным положением атомов белка. Затем рассчитывали траектории МД длиной 200 нс без ограничений. Аналогичным образом получали траектории для мономеров белков (в  $\alpha$ -спиральной конформации) и для липидного бислоя без встроенных белков. Распределения средней плотности липидов рассчитывали в нескольких продольных срезах бислоя, соответствующих различной глубине относительно его поверхности. Для этого строили трёхмерную ортогональную сетку с шагом 0,5 Å в плоскости бислоя и 10 Å (5 срезов) в перпендикулярном направлении. Центр сетки помещали в точку, соответствующую центру масс встроенного в мембрану белка, либо в произвольную точку в центре липидного бислоя. Среднюю плотность липидов рассчитывали как сумму масс атомов, находящихся в ячейке, делённую на её объём. Полученные значения усредняли по всей длине траекторий МД и визуализировали [14]. Для расчёта свободной энергии димеризации использовали метод “зонтичной” выборки (umbrella sampling) и интегрирование средней силы, действующей между мономерами. Разделение энергетических термов делали с помощью повторного вычисления параметров МД с учётом лишь части взаимодействий [15].

Все моделируемые пептиды были стабильны в ПОФХ, структуры димерных состояний незначительно изменялись за время МД. Рассчитанные профили свободной энергии ассоциации для изучаемых систем свидетельствуют о наличии стабильного (в той или иной степени) димерного состояния у каждого из пептидов (см. рис. 1). Для GrA дикого типа глубина минимума профиля свободной энергии димеризации составила  $-60 \pm 3$  кДж/моль, для мутантных форм T87V и G83A –  $-16 \pm 3$  кДж/моль и  $-30 \pm 5$  кДж/моль, соответственно. При этом для GrA T87V минимум на профиле свободной энергии смещён в сторону больших расстояний между мономерами, то есть димер имеет менее плотную “упаковку” спиралей. При рассмотрении энергии белок-белковых взаимодействий у GrA дикого типа наблюдали глубокий минимум на энергетическом профиле ( $-59 \pm 4$  кДж/моль), при этом мутант G83A практически не отличался от димера дикого типа, и имел энергетический профиль той же формы и глубины ( $-60 \pm 5$  кДж/моль), в то время как T87V был менее выгодным для белок-белковых взаимодействий ( $-25 \pm 6$  кДж/моль). Можно предположить, что мутация G83A затрагивает взаимодействие ТМ-домена GrA с липидным окружением, а не прямой контакт мономеров, тогда как T87V оказывает наиболее сильное воздействие на белок-белковые контакты, делая невозможным формирование межмолекулярной водородной связи [15]. Для PolyALA наблюдали невыгодное взаимодействие со средой в димерном состоянии: энергия белок-белковых взаимодействий этого пептида составила  $-25 \pm 6$  кДж/моль при полной энергии  $-16 \pm 3$  кДж/моль. Для PolyLEU белок-белковые взаимодействия не являются достоверно выгодными, и, вероятно, склонность его к ассоциации связана с эффектами среды ( $-14 \pm 3$  кДж/моль). Таким образом, можно заключить, что последовательность ТМ-домена гликофорина А оптимизирована как для непосредственных белок-белковых взаимодействий, так и для взаимодействия со средой в димерном состоянии. При рассмотрении искусственных пептидов выгодной является только одна из компонент энергии димеризации. Так, PolyALA оказывается выгодным для белок-белковых контактов, однако мембрана уменьшает его энергию

димеризации, приводя мономеры в более плотный контакт по сравнению с их собственным равновесным положением. Димеризация PolyLEU, наоборот, оказывается выгодной только за счёт эффектов среды, вероятно, за счёт уменьшения области возмущения липидов при сборке димера. При сравнении энергетических профилей GrA можно отметить, что энергия взаимодействий белок-белок быстро стремится к нулю с увеличением расстояния между спиралью, тогда как при рассмотрении полной системы профиль свободной энергии отличен от нуля при расстояниях 15-18 Å между мономерами GrA.

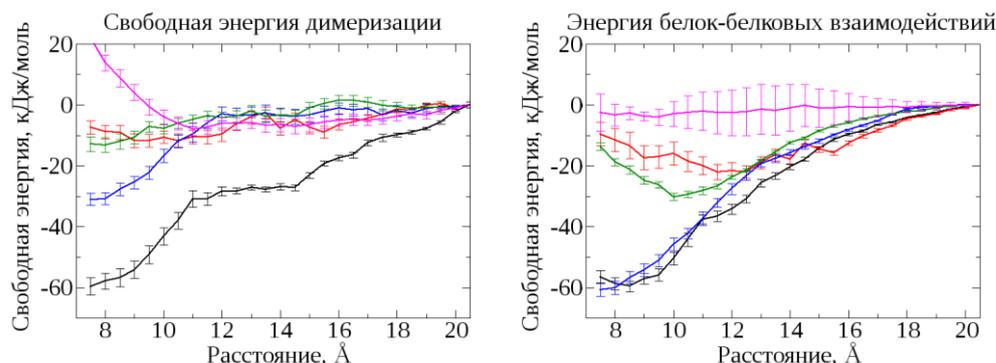


Рисунок 1 – профили свободной энергии димеризации (слева) и энергии белок-белковых взаимодействий (справа) ТМ-пептидов в ПОФХ для GrA дикого типа (чёрный), мутантных форм GrA T87V (красный), G83A (синий) и модельных пептидов PolyALA (зелёный) и PolyLEU (фиолетовый)

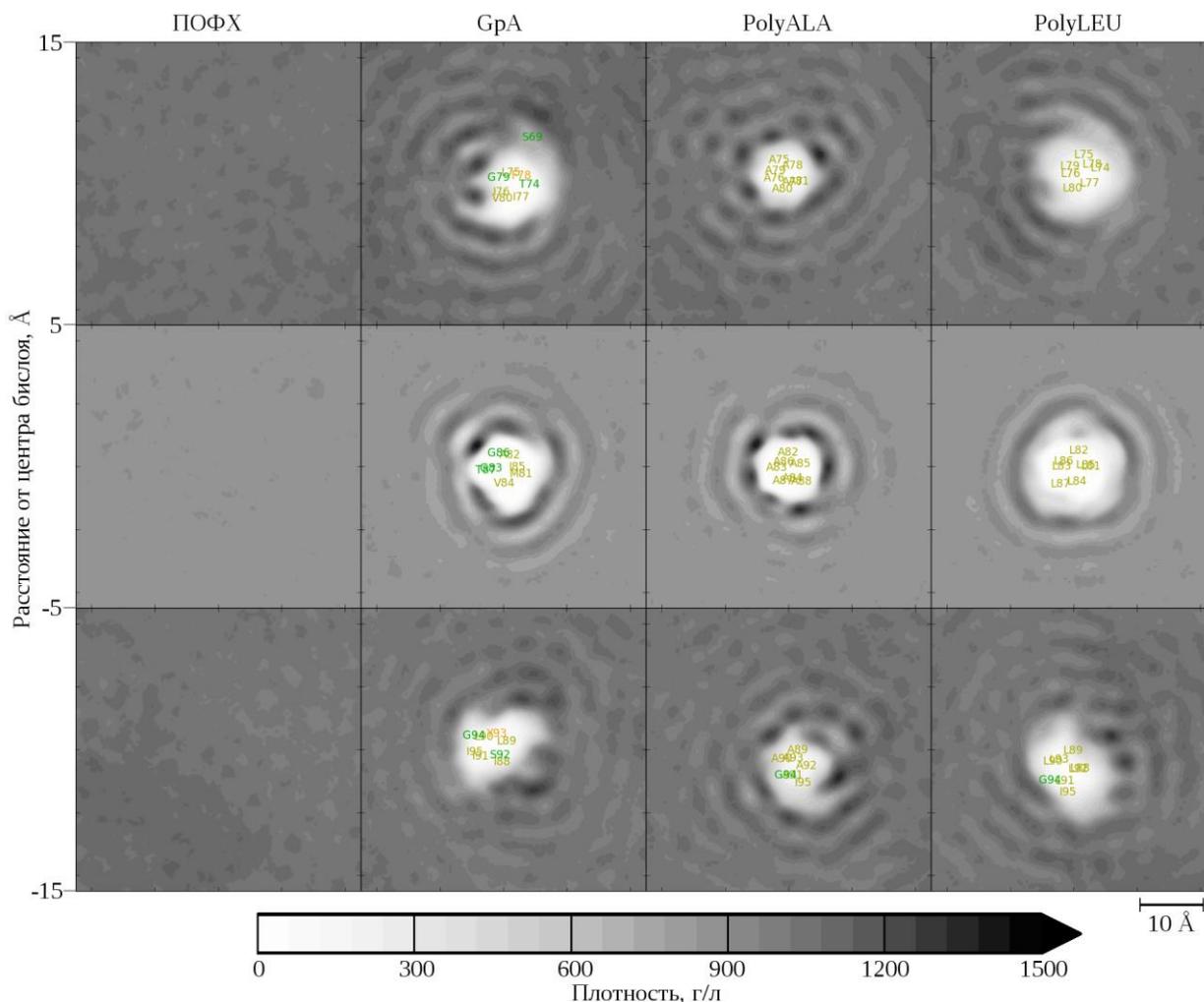


Рисунок 2 – Распределение средней плотности липидов в продольных срезах бислоя для “чистого” ПОФХ и для бислоя, содержащего мономеры GrA, PolyALA и PolyLEU. Белые области на картах плотности бислоя с белками соответствуют их  $\alpha$ -спиралям. На картах отмечено среднее положение C $\alpha$ -атомов белка: зелёным цветом обозначены полярные остатки, жёлтым – неполярные алифатические, оранжевым – ароматические

Рассмотрение пространственного распределения плотности липидов вблизи мономеров ТМ-пептидов показало наличие вблизи их поверхности стабильно существующих максимумов плотности в области ацильных цепей липидов (см. рис. 2). В области полярных головок (на рис. 2 не показаны) не наблюдали различий между “чистым” ПОФХ и бислоем со встроенным белком. В области ацильных цепей время жизни связанных липидов вблизи пептидов составляло около 100 нс, что гораздо выше, чем для возмущений в “чистом” ПОФХ (до 10 нс). Для PolyLEU липиды формируют два кольца с повышенной плотностью, которые имеют радиальную симметрию относительно оси пептида. В случае PolyALA наличие отдельно различимых максимумов плотности говорит о более строгой локализации ацильных цепей вблизи поверхности пептида. Причиной этому может служить более жёсткая поверхность спирали этого пептида с регулярным расположением коротких боковых цепей аланина. Наиболее сложное распределение неоднородностей в бислое формирует GrA, для которого максимумы плотности наблюдали вблизи остатков глицина. Таким образом, можно заключить, что ацильные цепи липидов заполняют все неровности поверхности ТМ-пептидов, которые в случае GrA формируют сайты связывания ацильных цепей липидов вблизи остатков глицина G79 и G83. При димеризации указанных пептидов наблюдали перераспределение возмущений в липидном бислое. Области возмущений липидов вокруг мономеров начинали перекрываться при расстоянии 15-18 Å между ними, что можно соотнести с изменениями на профилях свободной энергии. В результате для GrA наблюдали появление новых сайтов локализации липидов на боковых (относительно интерфейса димеризации) поверхностях димера, и распределение возмущений становилось симметричным. Для PolyLEU и PolyALA, наоборот, симметрия терялась и распределение плотности липидов становилось менее регулярным [14]. Сравнение степени гетерогенности распределений плотности для этих двух пептидов показало, что димеризация PolyLEU является более выгодной, вероятно, из-за уменьшения области возмущений и появления в димере возможности для связывания с липидами. Для PolyALA получали противоположный эффект: его димеризация не приводила ни к значительному уменьшению площади гетерогенностей, ни к улучшению связывания с липидами.

В результате работы показано, что в процессе димеризации ТМ-доменов белков липидная мембрана играет активную роль. В случае таких пептидов как полилейцин именно взаимодействие с мембраной обуславливает его склонность к димеризации. В то же время, мутации в аминокислотной последовательности белка могут в значительной степени нарушать белок-липидные взаимодействия, что показано на примере мутантной формы G83A гликофорина А. Таким образом, водно-липидная среда является активным игроком в процессе функционирования рецепторных систем клетки, и её роль необходимо учитывать при рассмотрении работы мембранных белков, а также при рациональном конструировании новых молекул, способных заданным образом модулировать работу сигнальных и других мембранных систем, в первую очередь - рецепторных тирозинкиназ.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 14-14-00871).*

#### **Список литературы / References:**

1. Bagatolli L.A., Ipsen J.H., Simonsen A.C., Mouritsen O.G. An outlook on organization of lipids in membranes: Searching for a realistic connection with the organization of biological membranes. *Prog. Lipid Res.*, 2010, vol. 49, no. 4, pp. 378-389.
2. Teese M.G., Langosch D. Role of GxxxG Motifs in Transmembrane Domain Interactions. *Biochemistry*, 2015, vol. 54, no. 33, pp. 5125-5135.
3. Regad T. Targeting RTK Signaling Pathways in Cancer. *Cancers*, 2015, vol. 7, no. 3, pp. 1758-1784.
4. Arpel A., Sawma P. [et al.] Transmembrane domain targeting peptide antagonizing ErbB2/Neu inhibits breast tumor growth and metastasis. *Cell Rep.*, 2014, vol. 8, no. 6, pp. 1714-1721.
5. Li E., Hristova K. Receptor tyrosine kinase transmembrane domains: Function, dimer structure and dimerization energetics. *Cell Adhes. Migr.*, 2010, vol. 4, no. 2, pp. 249-254.
6. Sawma P., Roth L. [et al.] Evidence for New Homotypic and Heterotypic Interactions between Transmembrane Helices of Proteins Involved in Receptor Tyrosine Kinase and Neuropilin Signaling. *J. Mol. Biol.*, 2014, vol. 426, no. 24, pp. 4099-4111.
7. Fink A., Sal-Man N., Gerber D., Shai Y. Transmembrane domains interactions within the membrane milieu: Principles, advances and challenges. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.*, 2012, vol. 1818, no. 4, pp. 974-983.
8. Anbazhagan V., Schneider D. The membrane environment modulates self-association of the human GpA TM domain – Implications for membrane protein folding and transmembrane signaling. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.*, 2010, vol. 1798, no. 10, pp. 1899-1907.
9. Bocharov E.V., Mayzel M.L. [et al.] Spatial Structure and pH-dependent Conformational Diversity of Dimeric Transmembrane Domain of the Receptor Tyrosine Kinase EphA1. *J. Biol. Chem.*, 2008, vol. 283, no. 43, pp. 29385-29395.
10. Caputo G.A. Analyzing the Effects of Hydrophobic Mismatch on Transmembrane  $\alpha$ -Helices Using Tryptophan Fluorescence Spectroscopy. in *Membrane Proteins*, ed. by G. Ghirlanda and A. Senes, Humana Press, 2013, pp. 95-116.
11. 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.
12. Berger O., Edholm O., Jähnig F. Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophys. J.*, 1997, vol. 72, no. 5, pp. 2002-2013.

13. Минеев К.С., Бочаров Э.В. [и др.] Структура димера трансмембранного домена гликофорина А в окружении липидов и детергентов. *Acta Naturae*, 2011, т. 3, № 2, с. 94-102. [Mineev K.S., Bocharov E.V. [et al.] Dimeric structure of the transmembrane domain of glycoporphin a in lipidic and detergent environments. *Acta Naturae*, 2011, vol. 3, no. 2, pp. 90-98. (In Russ.)]

14. Kuznetsov A.S., Polyansky A.A., Fleck M., Volynsky P.E., Efremov R.G. Adaptable Lipid Matrix Promotes Protein-Protein Association in Membranes. *J. Chem. Theory Comput.*, 2015, vol. 11, no. 9, pp. 4415-4426. [Kuznetsov A.S., Polyansky A.A., Fleck M., Volynsky P.E., Efremov R.G., Adaptable Lipid Matrix Promotes Protein-Protein Association in Membranes. *J. Chem. Theory Comput.*, 2015, vol. 11, no. 9, pp. 4415-4426. (In Russ.)]

15. Кузнецов А.С., Волынский П.Е., Ефремов Р.Г. Роль липидного окружения в процессе димеризации трансмембранных доменов гликофорина А. *Acta Naturae*, 2015, т. 7, № 4, с. 135-140. [Kuznetsov A.S., Volynsky P.E., Efremov R.G., Role of the Lipid Environment in the Dimerization of Transmembrane Domains of Glycophorin A. *Acta Naturae*, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 122-127. (In Russ.)]

### ХИРАЛЬНЫЙ ДУАЛИЗМ КАК СИСТЕМНЫЙ ФАКТОР В МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Твердислов В.А., Малышко Е.В., Жулябина О.А., Ильченко С.А., Яковенко Л.В.  
ФГБОУ ВО “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”,  
ул. Ленинские горы, 1, корп. 2, г. Москва, 119991, Россия  
e-mail: tverdislov@mail.ru

**Аннотация.** Обосновывается модель знакопеременной хиральной периодичности в иерархиях структур белков и нуклеиновых кислот, а также хиральных соответствий при взаимодействиях макромолекул одинаковых и разных классов. Выявлено закономерное чередование знака хиральности D-L-D-L при переходе на более высокий уровень структурно-функциональной организации ДНК (первичной структурой назначается полимерная цепь дезоксирибозы), а также смены знака хиральности в иерархии белковых структур L-D-L-D. Хиральная противофазность белков и ДНК формирует базовый структурный блок молекулярной биологии как ахиральный инвариант, позволяющий реализовать хиральные мотивы при взаимодействиях молекул одинаковых и разных классов с помощью взаимодействий конкретных химических групп. Перспективы практического применения развиваемого подхода связаны с моделированием взаимодействия хиральных лекарственных веществ с макромолекулами-мишенями, а также с подбором хиральных криопротекторов в методиках, связанных с криоконсервацией биоматериалов.

**Ключевые слова:** хиральность, нуклеиновые кислоты, белки, иерархии структур.

### CHIRAL DUALISM AS A SYSTEM FACTOR IN MOLECULAR BIOLOGY

Tverdislov V.A., Malyshko E.V., Zhulyabina O.A., Ilchenko S.A., Yakovenko L.V.  
M.V. Lomonosov Moscow State University  
GSP-1, 1-2 Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russia  
e-mail: tverdislov@mail.ru

**Abstract.** A model for chiral periodicity with alternating chiral sense in hierarchies of protein and nucleic acid structures is proposed and substantiated. The model describes also chiral conformities in interactions of macromolecules of the same or different types. Regular alternation of the chirality sense is revealed in transitions from the lowest to higher levels of structural-functional organisation both in DNA molecules where it is D-L-D-L (the structure of the deoxyribose polymeric chain is taken to be the primary structure), and in proteins where it is shifted in chiral phase to L-D-L-D. Such cross-chiral (antiphase) correspondence between proteins and DNAs forms the basic structural unit of molecular biology as an achiral invariant allowing to realise chiral motifs in the interactions of molecules of same or different classes through interactions of specific chemical groups. Prospects of practical application of the approach developed here is related to the modelling of the interaction of chiral drugs with macromolecular targets as well as with the selection of chiral cryoprotectants in the methods associated with the cryopreservation of biomaterials.

**Key words:** chirality, nucleic acids, proteins, structural hierarchies.

Структурно-функциональная иерархичность биологических систем всех уровней, подобно дискретности и термодинамической неравновесности, является одним из важнейших принципов формирования земных форм жизни. Биологические иерархии сопрягают разномасштабные в пространстве и времени функции живых систем. Вместе с тем, даже на базовом молекулярно-биологическом уровне этот признак не формулируется системно, а вместо него используется химическая классификация или перечисление характерных особенностей соответствующих структур. В белках и нуклеиновых кислотах выделяют первичные, вторичные и т.д. структуры, однако универсального физического критерия, отражающего общий принцип подобной стратификации, в молекулярной биологии не существует.

Авторами предложен и разрабатывается новый подход к решению этой проблемы, основанный на представлениях о хиральности отдельных субмолекулярных и надмолекулярных структур, составленных молекулярными блоками, включающими асимметричный углерод, или же спиральными и суперспиральными образованиями [1-3]. С этих позиций молекулярная биология приобретает принципиально новый аспект – предстаёт как периодическая система хиральных элементов. Подход позволяет выполнить единую сквозную классификацию структурных уровней белков и нуклеиновых кислот, позволяющую с общих позиций