

12. Portnaya I., Cogan U., Livney Y.D., Ramon O., Shimoni K., Rosenberg M., Danino D. Micellization of bovine b-casein studied by isothermal titration microcalorimetry and cryogenic transmission electron microscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, vol. 54, iss. 15, pp. 5555-5561.

13. Lakowicz J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer Science, 2006, 954 p.

14. Myrdal P.B., Yalkowsky S.H. Solubilization of drugs in aqueous media. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York: Marcel Dekker, 2002, vol. 3, pp. 2458-2580.

15. Adams M.L., Andes D.R., Kwon G.S. Amphotericin B encapsulated in micelles based on poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid) derivatives exerts reduced in vitro hemolysis but maintains potent in vivo antifungal activity. *Biomacromolecules*, 2003, vol. 4, iss. 3, pp. 750-757.

РОЛЬ ЛИПИДНОГО ОКРУЖЕНИЯ В ДИМЕРИЗАЦИИ СПИРАЛЬНЫХ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ БЕЛКОВ

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

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, ГСП-7, 117997, РФ

² Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»
ул. Мясницкая, 20, Москва, 101000, РФ
e-mail: andrej.kuznecov@phystech.edu

Аннотация. Трансмембранные домены большинства мембранных белков представляют собой отдельные α -спирали или их пучки. Они принимают непосредственное участие в функционировании мембранных рецепторов и ионных каналов, а также обеспечивают формирование их правильной пространственной структуры. Таким образом, спираль-спиральные взаимодействия в липидном окружении вовлечены в ключевые процессы жизнедеятельности клетки. На смену концепции мотивов димеризации, описывающей взаимодействие белков в мембране исключительно через непосредственные контакты, пришло представление о мембране как об активной среде, влияющей на поведение встроженных белков. В настоящей работе с помощью метода молекулярной динамики исследовали поведение трансмембранного сегмента гликофорина А и двух искусственных полипептидов на базе полиаланина и полилейцина в гидратированном липидном бислое. Показали, что мономеры и образуемые димеры имеют на поверхности спиральных трансмембранных фрагментов сайты взаимодействия с молекулами липидов. Для мономера гликофорина А наиболее ярко выраженный сайт связывания липидов соответствует интерфейсу его димеризации. Перераспределение связанных молекул липидов при формировании димера способствует стабилизации димерного состояния за счёт энтропийного вклада в свободную энергию ассоциации.

Ключевые слова: мембранные белки, гликофорин А, рецепторные тирозинкиназы, белок-белковые взаимодействия.

THE ROLE OF LIPID ENVIRONMENT IN DIMERIZATION OF PROTEIN HELICAL TRANSMEMBRANE DOMAINS

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

¹ 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

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

Abstract. Transmembrane domains of the most membrane proteins consist of single α -helices or their bundles. They take part in the functioning of receptors and ion channels and provide spatial structure formation. Thus, helix-helix interactions in lipid environment are involved in crucial processes of cell functioning. The concept of dimerization motifs representing protein-protein interactions as direct residue contacts is now replaced with the model of active membrane medium affecting embedded proteins. In the present work computer molecular dynamics simulations have been used to study the behavior of the transmembrane segment of glycoporphin A and two artificial polypeptides (based on polyalanine and polyleucine) in hydrated lipid bilayers. It was demonstrated that both monomers and dimers present lipid interaction sites on the surface of helical transmembrane segments. In the case of glycoporphin A monomer, the most prominent interaction site corresponds to the dimerization interface. The redistribution of bound lipid molecules during dimer formation stabilizes the dimeric state with the entropy contribution into the association free energy.

Key words: membrane proteins, glycoporphin A, receptor tyrosine kinases, protein-protein interactions.

Структурной основой клеточной мембраны является липидный бислой – стабильная структура, образуемая молекулами липидов в водном окружении. В то же время, в составе мембран клетки присутствует множество различных белков [1]. Трансмембранные (ТМ) домены большинства мембранных белков представлены одной или несколькими α -спиралями, взаимодействующими между собой в липидном окружении. Таким образом, спираль-спиральные взаимодействия лежат в основе работы мембранных систем клетки. Нарушение этих взаимодействий из-

за точечных мутаций или других факторов приводит к формированию неправильных конформаций белков, являющихся полностью неактивными, либо, наоборот, постоянно активированными [2]. И то, и другое может приводить к развитию патологических состояний организма, например, раку, болезни Альцгеймера или диабету. Для воздействия на такие патологии важно детально понимать принципы упаковки ТМ-доменов белков с учётом их мембранного окружения. Ранее предполагалось, что основную роль во взаимодействии белков играют расположенные определённым образом отдельные аминокислотные остатки [3]. К настоящему моменту выявлено, в процессе димеризации ТМ-доменов принимает непосредственное участие липидная мембрана, причём взаимодействие белок-липиды в ряде случаев является определяющим и специфичным [4]. Сайты связывания молекул липидов найдены в ТМ-доменах ионных каналов и G-белок сопряжённых рецепторов [5]. Показано, что даже одиночные α -спирали способны специфичным образом взаимодействовать с фосфолипидами в модельных системах [6]. Настоящая работа разрабатывает ранее предложенные подходы к исследованию белок-белковых и белок-липидных взаимодействий на молекулярном уровне. Более детальное понимание механизмов взаимной адаптации ТМ-доменов белков и их локального липидного окружения поможет в будущем создавать терапевтические агенты, нацеленные на мембранные белки, обладающие повышенной эффективностью за счёт учёта среды и опосредованного действия на локальное липидное окружение.

Настоящая работа посвящена исследованию взаимного влияния белка и мембранной среды в процессе димеризации ТМ-доменов гликофорина А (GrA) [7] и модельных полипептидов на базе полиаланина и полилейцина с помощью метода молекулярной динамики (МД). Для получения информации о воздействии мономеров и димеров на свойства липидной мембраны рассчитывали пространственное распределение средней плотности липидов и оценивали гетерогенность пространственного распределения плотности липидов. В работе использовали модели гидратированных липидных бислоев (мембран) из пальмитоилолеоилфосфатидилхолина (ПОФХ). Пептиды (мономеры и димеры) встраивали в предварительно уравновешенные модели мембран, удаляли молекулы липидов и воды, пересекающиеся с белком, проводили минимизацию энергии системы методом наискорейшего спуска и релаксацию окружения в МД при фиксированном положении пептидов.

Применяли программный пакет для МД Gromacs версии 4.6.7 и 5.1.2 [8], для описания молекул белка использовали параметры силового поля Gromos 43a2, для липидов – набор параметров, предложенный Бергером [9], для воды – модель SPC. Использовали периодические граничные условия по всем направлениям прямоугольной расчётной ячейки. Температуру поддерживали независимо для белка, липидов и воды с помощью алгоритма термостата V-rescale, давление – с помощью баростата Парринелло-Рахмана отдельно в плоскости мембраны и в перпендикулярном направлении. Для описания электростатических взаимодействий использовали суммирование по Эвальду, ван-дер-ваальсовых – потенциал Леннарда-Джонса с функцией обрезания потенциала. Картирование распределения плотности липидов проводили в прямоугольной, либо цилиндрической системе координат (см. рис. 1). В первом случае бислой делили на 5 срезов, параллельных его плоскости, толщина каждого среза составляла 10 Å, за центр ячейки принимали середину отрезка между максимумами распределения атомов фосфора, шаг ортогональной сетки по осям X и Y составлял 0,5 Å. Во втором случае ось Z выбирали сонаправленной с осью α -спирали пептида (одного из мономеров в случае димера) и рассматривали цилиндрические срезы с шагом по радиальному направлению 2 Å. Шаг сетки по ϕ составлял 3°, по оси Z – 0,5 Å. Значения плотности в ячейках усредняли по всей длине траектории.

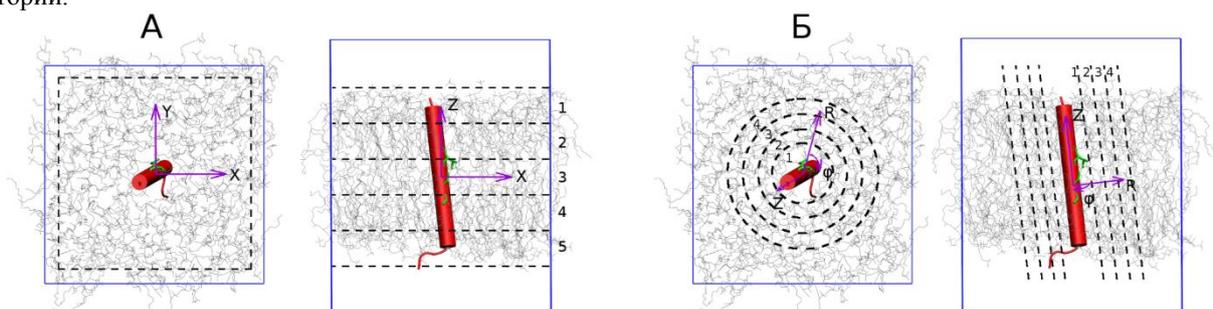


Рисунок 1 – Разбиение липидного бислоя на срезы для построения карт пространственного распределения плотности липидов с использованием декартовой (А) и цилиндрической (Б) системы координат, вид сверху и сбоку. Спиральный фрагмент пептида показан цилиндром, серым цветом представлены молекулы липидов. Сплошной линией обозначены границы расчётной ячейки, пунктирными линиями – границы срезов, подписаны номера срезов. Показано направление осей системы координат

Гетерогенность распределения плотности липидов оценивали с использованием ортогональных сеток. В качестве исходных данных для расчётов использовали матрицы значений плотности липидов в ячейках сетки. В каждом срезе значение энтропии оценивали по формуле Шеннона:

$$H(x) = - \sum_{i=1}^n p(i) \log_2 p(i).$$

Здесь $p(i)$ – вероятность найти ячейку со значением плотности, лежащем на определённом отрезке. Использовали разбиение на 100 отрезков значений от 0 до 1500 г/л. Оценку энтропии для всего бислоя получали суммированием

значений для каждого из его срезов. Изменение степени гетерогенности при димеризации определяли как разность между значением энтропии для бислоя, содержащего пептиды в димеризованном и диссоциированном состояниях.

Ранее нами было показано, что значительных изменений структуры пептидов в исследуемых системах в ходе расчётов МД не происходит [6, 10]. Таким образом, мы привязывали к ним систему координат и анализировали в ней распределение липидов в ближайшем окружении. Основным преимуществом цилиндрической системы координат перед применявшейся ранее декартовой является возможность непосредственного соотнесения сайтов связывания липидов с положением аминокислотных остатков [6]. Для пептидов на базе полиаланина и полилейцина имеет место регулярное распределение возмущений плотности, отражающее рельеф поверхности самого белка (см. рис. 2). Так, для первого из них «липидная оболочка» представляет собой сетку, в ячейках которой находятся короткие боковые цепи остатков аланина. На больших расстояниях данная структура, однако, теряется и распределение становится однородным. Для второго искусственного полипептида, напротив, неоднородность липидного окружения сохраняется для трёх цилиндрических срезов (с радиусами 5-9 Å), а максимумы плотности представляют собой регулярно расположенные линии, что может быть обусловлено спиральной структурой пептида. Следует отметить, что, несмотря на менее выраженный контраст, данная картина является более устойчивой с увеличением расстояния. Гликофорин А демонстрировал формирование нескольких отчетливых сайтов связывания липидов на своей поверхности, наиболее ярко выраженный из них совпадал с положением «малых» остатков, и, соответственно, с интерфейсом димеризации. Также этот ТМ-домен имеет несимметричное распределение липидов на разных сторонах спирали. При димеризации происходило перераспределение связанных липидов: появлялись новые максимумы плотности, расположенные вдоль линии взаимодействия мономеров. При димеризации искусственных полипептидов также наблюдалось изменение положения сайтов связывания липидов, однако формирования стабильных протяжённых максимумов плотности вблизи интерфейса димеризации не наблюдали (данные не приведены).

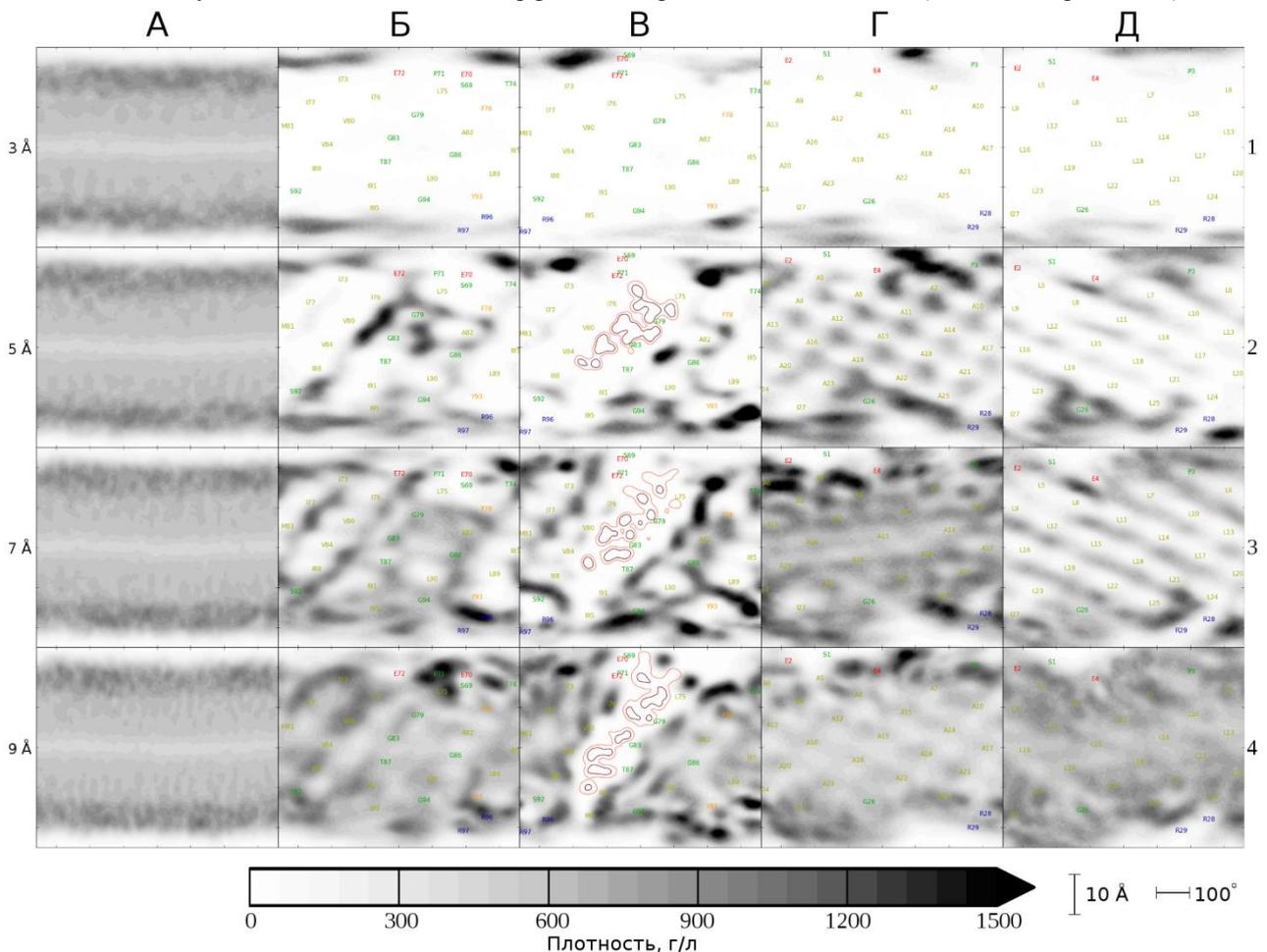


Рисунок 2 – Карты распределения средней плотности липидов ПОФХ в “чистом” бислое (А), вблизи мономера GrA (Б), димера GrA (В) и мономеров полипептидов на базе полиаланина (Г) и полилейцина (Д), построенные в цилиндрических координатах. Слева указан средний радиус среза, справа – его номер. Для димера GrA контурами отмечена область контакта мономеров. На картах показано среднее положение Са-атомов соответствующих остатков пептидов

Рассчитанные значения степени гетерогенности распределений плотности липидов зависят от времени усреднения. Для мембраны, содержащей пептиды, зависимость сохраняется до 200 нс. Для “чистого” бислоя ПОФХ получили значения гетерогенности $15,9 \pm 0,1$ в сумме и $1,97 \pm 0,01$ для центрального среза при времени усреднения более 100 нс. При встраивании мономеров в мембрану ПОФХ степень гетерогенности растёт в ряду PolyALA < GrA <

PolyLEU. При димеризации гетерогенность уменьшается, то есть димер вносит в свойства мембраны меньшие возмущения, чем два мономера (см. рис. 3). Наиболее значительное уменьшение гетерогенности наблюдали при димеризации пептида на базе полилейцина, тогда как для последовательности полиаланина получили наименьшую оценку. Для GrA получили среднее значение. Таким образом, наибольший вклад липидное окружение вносит в процесс димеризации полипептида на базе полилейцина, а димеризация полиаланина является наименее выгодной.

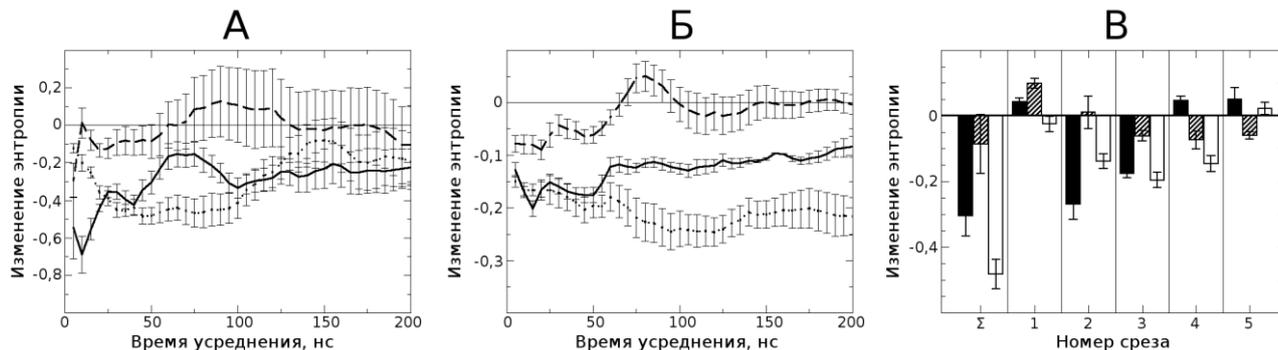


Рисунок 3 – Изменение степени гетерогенности (энтропии Шеннона) распределений плотности липидов при димеризации GrA (сплошная линия) и полипептидов на базе полиаланина (штриховая линия) и полилейцина (пунктир) в зависимости от времени усреднения для полного бислоя (А) и для центрального среза (Б). Результирующие значения разности степени гетерогенности связанного и несвязанного состояний ТМ-пептидов GrA (сплошная заливка), PolyALA (штриховка) и PolyLEU (без заливки) для времени усреднения 50 нс (В)

Результаты атомистического моделирования взаимодействия ТМ-доменов гликофорина А и двух искусственных пептидов показали, что липидная мембрана играет важную роль в образовании димера GrA, наряду с непосредственным контактом между аминокислотными остатками. Одним из ключевых выводов настоящей работы является то, что в отсутствие второго мономера белка сайт димеризации GrA занят связанными молекулами липидов. При формировании димера картина распределения липидов меняется, что хорошо видно с помощью визуализации в цилиндрической системе координат. Оценка изменения степени гетерогенности липидного бислоя вблизи встроенных ТМ-пептидов говорит в пользу энтропийного характера димеризации пептида на базе полилейцина и природного ТМ-сегмента GrA. Такой результат в значительной степени расширяет концепцию “мотивов димеризации”, что позволяет по-новому взглянуть на уже имеющиеся экспериментальные данные о роли точечных мутаций в ассоциации ТМ-доменов. Наряду с полученными ранее данными, результаты настоящей работы говорят в пользу активного участия липидной мембраны в белок-белковых взаимодействиях и позволяют полагать, что мембранные белки могут взаимодействовать друг с другом через липидное окружение на значительном удалении, поскольку возмущения в липидном бислое распространяются на расстояние более 10 Å от ТМ-домена. 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 терапевтических агентов, способных заданным образом модулировать работу сигнальных, транспортных и других мембранных систем клетки.

Работа выполнена в рамках Проекта «5-100» государственной поддержки ведущих университетов Российской Федерации, программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российского Фонда фундаментальных исследований (грант 16-04-00578). Авторы благодарны СКЦ «Политехнический» СПбПУ и МСЦ РАН за предоставленные суперкомпьютерные ресурсы.

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. 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.
3. Teese M.G., Langosch D., Role of GxxxG Motifs in Transmembrane Domain Interactions. *Biochemistry*, 2015, vol. 54, no. 33, pp. 5125-5135.
4. 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.
5. Hedger, G., Sansom, M.S.P. Lipid interaction sites on channels, transporters and receptors: Recent insights from molecular dynamics simulations. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.*, 2016, vol. 1858, no. 10, pp. 2390-2400.
6. 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.

7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Кузнецов, А.С., Ефремов Р.Г. Оценка влияния среды на димеризацию трансмембранных доменов гликофорина А в компьютерном эксперименте. *Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2016: материалы XI международной научно-технической конференции*, Севастополь, 2016, т. 1, № 1, с. 250-253. [Kuznetsov A.S., Efremov R.G. In Silico Estimation of the Membrane Effect on the Dimerization of Transmembrane Domains of Glycophorin A. *Aktualnie voprosy biologicheskoy fiziki i himii. BFFH-2016: Proceedings of XI International Science-Technical Conference*, Sevastopol, 2016. v. 1, no. 1, pp. 250-253 (In Russ.)]

ТРАНСЛЯЦИОННАЯ ДИФФУЗИЯ БЕЛКОВ В ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННЫХ РАСТВОРАХ

Кусова А.М.^{1,2}, Ситницкий А.Э.¹, Идиятуллин Б.З.¹, Бакирова Д.Р.¹, Зуев Ю.Ф.^{1,2}

¹ Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН
ул. Лобачевского, 2/31, Казань, РФ

² Казанский (Приволжский) Федеральный Университет
ул. Кремлевская, 18, Казань, РФ
e-mail: alexakusova@mail.ru

Аннотация. В настоящем исследовании основное внимание уделяется получению обобщенной концентрационной зависимости коэффициента самодиффузии (КСД) трипсина и α – химотрипсина в качестве представителей глобулярных сфероидальных белков и фибриногена в качестве примера белка сложного строения, имеющего сильно вытянутую форму с глобулярными и неструктурированными участками. Эксперименты проводились методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) с использованием импульсного градиента магнитного поля (ИГМП). Полученная обобщенная концентрационная зависимость КСД белков проанализирована в рамках феноменологического подхода, основанного на фрикционном формализме неравновесной термодинамики. Показана возможность использования данного феноменологического подхода для белков различной формы и размеров в широком диапазоне концентраций. Определены динамические параметры системы, а именно: коэффициенты трения между молекулами белка и между молекулами белка и растворителем. Предложено качественное объяснение полученных значений.

Ключевые слова: ЯМР, диффузия, белки, концентрационная зависимость КСД.

TRANSLATIONAL DIFFUSION OF PROTEINS IN HIGHLY CONCENTRATED SOLUTIONS

Kusova A.M.^{1,2}, Sinitzky A.E.¹, Idiyatullin B.Z.¹, Bakirova D.R.¹, Zuev Yu.F.^{1,2}

¹ Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Russian Academy of Sciences
Lobachevsky str., 2/31 Kazan, Russia

² Kazan (Volga Region) Federal University
Kremlevskaya str., 18, Kazan, Russia
e-mail: alexakusova@mail.ru

Abstract. The present study focuses on obtaining a generalized concentration dependence of the self-diffusion coefficient for trypsin and α -chymotrypsin as representatives of globular spheroidal proteins and for fibrinogen as an example of irregular-shaped protein. Diffusion experiments were performed by nuclear magnetic resonance (NMR) using a pulsed magnetic field gradient (PFG). The resulting generalized concentration dependence of the self-diffusion coefficient of proteins was analyzed within the framework of known theoretical approach - phenomenological approach based on the frictional formalism of non-equilibrium thermodynamics. We showed the possibility of using the phenomenological approach to describe the mobility of proteins of various shapes and sizes over a wide range of concentrations. The dynamic parameters of the system were determined: friction coefficients between protein molecules and friction coefficients between protein and solvent molecules. A qualitative explanation of the obtained values is proposed.

Key words: NMR, diffusion, proteins, concentration dependence.

Введение. Трансляционная и вращательная подвижность белков имеет большое значение для функционирования биологических систем. С ней связаны транспорт, термодинамическая стабильность, функциональная активность белков [1,2]. Коэффициент трансляционной диффузии полезен для прогнозирования их транспортных свойств в более концентрированных средах. Современные исследования показывают, что концентрация биологических макромолекул внутри клеток достигает 40 % [3]. Высокая концентрация макромолекул оказывает значительные эффекты на термодинамику и кинетику явлений в цитоплазме, влияя на ассоциацию и агрегацию макромолекул, стабильность белков, кинетику ферментативных и сигнальных процессов в биологических системах [4]. Интерпретация концентрации зависимости коэффициента самодиффузии имеет большое значение для определения вкладов различных межмолекулярных взаимодействий. В настоящее время хорошо изучена диффузия белков и разбавленных