

На правах рукописи

Нагибина Галина Сергеевна

**Метод стабилизации структуры белков, основанный на
определении и закреплении их «ослабленных» участков**

03.01.02 – Биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино – 2020

Работа выполнена в Группе спектроскопии белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института белка Российской академии наук.

Научный руководитель: Доктор физико-математических наук
Мельник Богдан Степанович

Официальные оппоненты: Доктор физико-математических наук
Кутышенко Виктор Павлович
(профессор, заведующий лабораторией ЯМР-исследований биосистем, ИТЭБ РАН, г. Пущино)
Кандидат биологических наук
Немашкалова Екатерина Леонидовна
(н.с., лаборатория новых методов в биологии, ФИЦ ПНЦБИ РАН (ИБП РАН), г. Пущино)

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН): Институт биохимии им. А.Н. Баха, Лаборатория молекулярной биотехнологии

Защита состоится «___» _____ 2020 г. в ___ часов ___ минут на заседании совета Д 002.093.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская область.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке ПНЦ РАН по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская область, и на сайте ИТЭБ РАН: <http://iteb.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат физ.-мат. наук

Ланина Н.Ф.

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

Стабильность структуры белка – важное фундаментальное свойство, оказывающее влияние на его структуру, функцию, экспрессию и растворимость. Термин «стабильность» подразумевает устойчивость структуры белка к внешним условиям (температура, рН, ионные условия, денатурант) и сохранение нативной структуры и функции. Стабильность белка имеет большое практическое значение для биотехнологической отрасли и является важным направлением исследований ученых, работающих с белками. Так, увеличение стабильности структуры необходимо для решения широкого спектра биотехнологических задач: от уменьшения подвижности структуры для лучшей кристаллизации белка до разработки и оптимизации условий выделения, очистки и хранения промышленных энзимов, антител и других терапевтических препаратов белковой природы.

Для увеличения стабильности белков активно применяются искусственно введенные дисульфидные связи. Известно, какими критериями должна обладать проектируемая дисульфидная связь для того, чтобы не нарушить нативную упаковку белка [Dombkowski, 2014]. Однако далеко не всегда понятно, в какой именно участок полипептидной цепи белка стоит ее вводить, чтобы повлиять на стабильность нативного или промежуточного состояний белка [Dani, 2003]. На сегодняшний день наиболее распространенным подходом к введению стабилизирующей дисульфидной связи является использование метода молекулярной динамики [Nakamura, 2018]. Несмотря на распространенность, такой подход не дает сто процентный результат. Кроме того, метод молекулярной динамики как инструмент для поиска стабильных вариантов белка не всегда применим для больших олигомерных белков и белковых комплексов.

Существуют теоретические подходы, которые могут предсказать, является ли белок нативно-развернутым или жестко-упакованным по его аминокислотной последовательности [Uversky, 2011]. Интересно, что такие программы предсказывают, что практически в любом структурированном белке есть небольшие (10-20 аминокислотных остатков) нативно-развернутые участки. При этом из кристаллографических и ЯМР данных следует, что эти участки ничем особо не отличаются от других участков в структуре белка. Мы предположили, что эти участки являются ослабленными, т.е. они подвижные и неспособны к самостоятельному, без дополнительных взаимодействий,

приобретению жесткой структуры. Именно такие участки могут служить целью для введения замен аминокислотных остатков в случае необходимости стабилизации структуры белка.

В данной работе предложен подход, позволяющий стабилизировать глобулярные белки. Суть подхода заключается в поиске ослабленных участков полипептидной цепи белка и их закреплении введением дисульфидной связи. Поиск ослабленных участков осуществляется с помощью программ, предсказывающих нативно-развернутые участки в белках. Дисульфидные связи, введенные в эти участки, могут стабилизировать белок или уменьшить его подвижность. Создание такого универсального для глобулярных белков подхода, актуально для развития молекулярной биологии и биотехнологии.

Цели и задачи исследования

Цель работы: разработка и проверка подхода, основанного на поиске «ослабленных» участков в структурированных белках и их дальнейшем закреплении дисульфидными связями, позволяющего повысить стабильность структуры белка на примере белков α -субъединицы Go-белка из *Drosophila melanogaster* (**Gao**), белка L1 из *Aquifex aeolicus* (**AaeL1**) и белка L1 из *Haloarcula marismortui* (**HmaL1**).

Для достижения заданной цели поставлены **задачи**:

1. Исследовать аминокислотные последовательности белков Gao, AaeL1 и HmaL1 с помощью программ PONDR-FIT и IsUnstruct, предсказывающих нативно-развернутые участки в белках, найти предположительно «ослабленные» участки последовательности.
2. Спроектировать дисульфидные связи, закрепляющие найденные в белках Gao, AaeL1 и HmaL1 участки.
3. Оценить влияние введенных дисульфидных связей на стабильность структуры белков Gao, AaeL1 и HmaL1.

Научная новизна

В работе развит и экспериментально подтвержден подход, направленный на стабилизацию глобулярных белков. Для стабилизации белка в его структуре определяются ослабленные участки, затем они закрепляются дисульфидными связями. Поиск ослабленных участков проводится с помощью программ, предсказывающих нативно-развернутые участки в белках (например, PONDR-FIT и IsUnstruct). Детальная проверка подхода проводилась на трех белках (Gao, AaeL1, HmaL1).

Теоретическая и практическая значимость работы

Подход, предложенный в работе, является новым инструментом для повышения стабильности структуры белка и может быть применен для

практически любого глобулярного белка. Такой подход может найти применение в области белковой инженерии, биотехнологии и фармакологии.

Методология диссертационного исследования

При проведении экспериментов использовали современные физические, биохимические и теоретические методы. Для биохимических экспериментов использовались реактивы от ведущих химических компаний. Последовательности генов проверялись секвенированием. Анализ аминокислотных последовательностей проводили с помощью актуальных версий программ с открытым доступом PONDR-FIT и IsUnstruct. Белки нарабатывали в штаммах-продуцентах *E. coli*. Очистку белков проводили методом хроматографии. Чистоту белковых препаратов проверяли электрофоретически. Стабильность белков исследовали современными физико-химическими методами, включая спектральные методы исследования и дифференциальную сканирующую микрокалориметрию.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты расчетов программ, предсказывающих нативно-развернутые участки полипептидной цепи, для глобулярных структурированных белков можно интерпретировать как предсказание «ослабленных» участков, стабилизация которых может повлиять на стабильность структуры белка в целом.

2. Закрепление дисульфидной связью участка структуры Gα_o, предсказанного «ослабленным», привело к стабилизации структуры белка на 4°C при тепловой денатурации.

3. Дисульфидная связь, закрепляющая участок белка AαeL1, предсказанный «не ослабленным», никак не повлияла на стабильность его структуры.

4. Дисульфидная связь, закрепляющая участок полипептидной цепи белка HαmL1, предсказанный «ослабленным», привела к стабилизации структуры белка на 10°C при тепловой денатурации.

Апробация результатов

Результаты работы были представлены на следующих конференциях и школах: 40th FEBS Congress (Берлин, Германия, 2015), международной конференции для молодых ученых «Biophysics. Biophotonics. Biotechnology» (Москва, Россия, 2016), IV конференции «Современные проблемы

молекулярной биофизики» (Санкт-Петербург, Россия, 2016), Молодежном научном форуме «OpenScience 2016» (Гатчина, Россия, 2016), 22-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология Наука XXI века» (Пущино, Россия, 2018), XII Международной научной конференции БФФХ-2018 (Севастополь, Россия, 2018), Третьей международной конференции «Физика – наукам о жизни» (Санкт-Петербург, Россия, 2019), XIV Международной научной конференции Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2019 (Москва, Россия, 2019).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 работ, из них 4 статьи в журналах из перечня ВАК и 7 тезисов конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа содержит введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, выводы и список цитированной литературы. Работа изложена на 118 страницах, содержит 18 рисунков и 2 таблицы. Список литературы включает 130 ссылок.

Содержание работы

Введение

Во Введении описывается актуальность темы исследования и ее научная новизна, формулируются цели и задачи, приводятся положения, выносимые на защиту.

Глава I. Обзор литературы

В первой части главы I проводится анализ литературных данных об искусственных дисульфидных связях в белках и особенностях их проектирования. Рассматривается применение искусственных дисульфидных связей для стабилизации структуры белка и других целей. Во второй части главы описываются современные методы предсказания нативно-развернутые участков в белках: программы, основанные на физико-химических свойствах аминокислотных остатков, обучении искусственных нейросетей и мета-подходы. В заключительной части главы дается описание белков, исследованных в работе: особенности их пространственной структуры и биологические функции.

Глава II. Материалы и методы исследования

В Главе Материалы и Методы исследования описываются использованные в работе методы наработки и очистки белков, физико-химические методы исследования структуры белков и их стабильности (абсорбционная и флуоресцентная спектроскопия, спектроскопия кругового дихроизма, дифференциальная сканирующая микрокалориметрия, электрофорез в ПААГ в присутствии ДСН, эксклюзионная хроматография); теоретические подходы к анализу аминокислотной последовательности белков (выравнивание аминокислотных последовательностей белков, визуализация пространственных структур макромолекул).

Предсказание нативно-развернутых участков в белках проводили с помощью программ PONDR-FIT [Xue, 2010] и IsUnstruct [Lobanov, 2013], имеющих открытый доступ в сети Интернет. Предсказания нативно-развернутости для одной и той же последовательности аминокислотных остатков белка (Gao, AaeL1 или HmaL1) были получены в результате реализации различных алгоритмов двух программ. Программа IsUnstruct [Lobanov, 2013] основана на модели Изинга для предсказания неупорядоченных остатков только на основе аминокислотной последовательности белка. Согласно модели, каждый аминокислотный остаток может находиться в одном из двух состояний: упорядоченном или неупорядоченном. Для составления предсказания использовалась модель Изинга, в которой термин взаимодействия между соседними аминокислотными остатками был заменен штрафом за изменение между состояниями (энергетический барьер). Программа предсказывает, какие именно участки белка подвижны.

PONDR-FIT [Xue, 2010] – мета-программа, объединяющая работу нескольких программ семейства PONDR. Работа каждой отдельной программы основана на анализе физико-химических свойствах аминокислотных остатков последовательности, их гидрофобности и заряженности. Для составления предсказания проводится обучение искусственных нейронных сетей на тренировочных наборах структур из базы белковых структур PDB, в которых методами ЯМР, кругового дихроизма и рентгеновского рассеяния идентифицированы неструктурированные участки белков. Также отдельно оценивается влияние близкого расположения N- и C- концов полипептидной цепи. Программа способна предсказывать как длинные (более 40 остатков), так и короткие нативно-развернутые участки.

Глава III. Результаты и обсуждение

1. Стабилизация α -субъединицы Go-белка *Drosophila melanogaster*

Существующие теоретические подходы, которые позволяют предсказывать нативно-развернутые участки в белках, исходя только лишь из аминокислотной последовательности. Такие программы предсказывают, что практически в любом жестко упакованном, структурированном белке есть небольшие (10-20 аминокислотных остатков) нативно-развернутые участки. Мы предположили, что алгоритмы, реализованные в программах типа PONDR-FIT и IsUnstruct, позволяют предсказывать не столько принадлежность участка полипептидной цепи белка к нативно-развернутым структурам (т.е. подвижность и слабоструктурированность), сколько неспособность таких участков самостоятельно приобретать пространственную структуру. Именно такие участки являются ослабленными и могут быть наилучшей мишенью для введения стабилизирующих структуру мутаций, а именно, дисульфидных связей. Мы решили проверить выдвинутое нами предположение на α -субъединице Go-белка (**Gao**) из *D. melanogaster*.

1.1. Поиск ослабленных участков в аминокислотной последовательности белка Gao

Белок Gao состоит из двух доменов: домен I формируется N- и C-концевыми участками полипептидной цепи белка (аминокислотные остатки 1-64 и 181-345), а домен II включает среднюю часть цепи (аминокислотные остатки 65-180) [Slep, 2008]. Домен I белка Gao обладает ГТФ-азной активностью и способен связывать молекулу ГДФ. Аминокислотная последовательность первого домена достаточно консервативна для различных организмов, в то время как последовательность домена II показывает большее различие по своему составу в белках из различных организмов. Мы предположили, что именно эти различия могут служить причиной нестабильности или подвижности домена II белка Gao из *D. melanogaster*. Поэтому мы решили повысить стабильность именно второго домена белка Gao.

Для поиска ослабленных участков в белке Gao мы использовали программы PONDR-FIT [Xue, 2010] и IsUnstruct [Lobanov, 2013]. Данные программы используют различные подходы для предсказания нативно-развернутых участков в белках: подход, использующий искусственные нейросети для сравнения структур белков с экспериментально-подтвержденными нативно-развернутыми участками [Xue, 2010], и алгоритм, работа которого основана на модели Изинга, предсказывающий подвижные участки в последовательности белка [Lobanov, 2013]. На рисунке 1 показана вероятность для разных аминокислотных остатков белка Gao быть в нативно-развернутом состоянии, по результатам предсказания неупорядоченных участков по первичной структуре белка программами PONDR-FIT и IsUnstruct. Видно, что графики, отражающие результаты работы двух независимых программ, похожи. Вертикальными пунктирными линиями выделен участок аминокислотной последовательности белка Gao, формирующий домен II (аминокислотные остатки 65-180). Программы предсказывают довольно высокую вероятность быть неупорядоченным для участка последовательности в районе 100-го аминокислотного остатка (аминокислотные остатки 90-120).

Именно этот ослабленный участок мы выбрали для стабилизации введением дисульфидной связи.

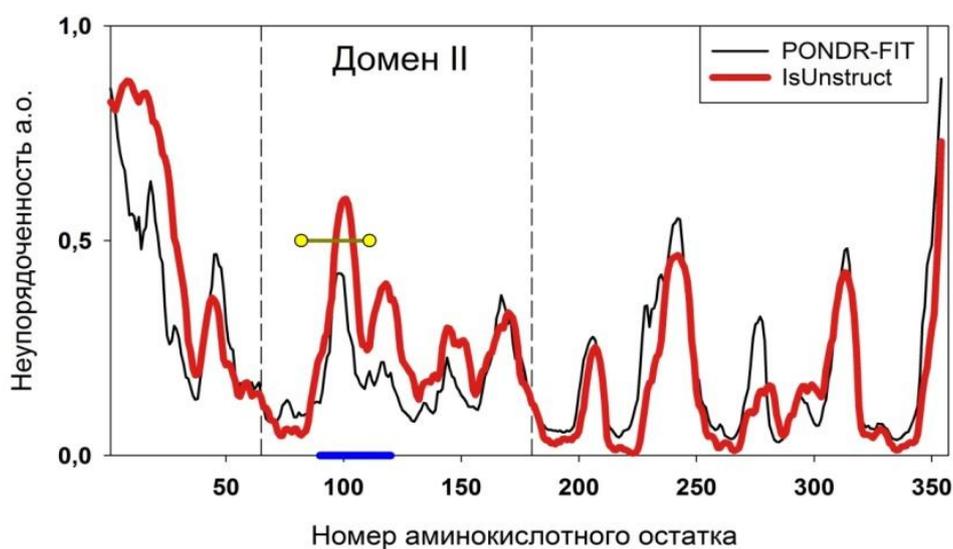


Рис. 1. Вероятность разных остатков в аминокислотной последовательности белка Gao из *D. melanogaster* быть неупорядоченными: вертикальными пунктирными линиями выделен участок, образующий домен II белка Gao; синей полоской внизу графика показан участок, стабильность которого предполагалось повысить введением дисульфидной связи; желтыми кружочками показано положение а.о., между которыми спроектирован цистеиновый мостик.

1.2. Выбор позиции для введения дисульфидной связи в Gao

Введение дисульфидной связи в белке Gao из *D. melanogaster* осложняется тем, что для этого белка не известна пространственная структура. Поэтому мы использовали довольно часто применяемый подход, суть которого состоит в следующем: (1) Выбираем белок с известной пространственной структурой, высоко гомологичный исследуемому нами белку, так называемый «модельный» белок. (2) В пространственной структуре «модельного» белка находим сближенные аминокислотные остатки, замена которых на цистеины приведет к образованию цистеинового мостика. (3) Сопоставляем (выравниваем) аминокислотные последовательности исследуемого белка и белка с известной пространственной структурой – «модельного». (4) По выравниванию аминокислотных последовательностей двух белков определяем, какие аминокислотные остатки в исследуемом белке соответствуют аминокислотным остаткам, выбранным для введения цистеинового мостика в «модельном» белке. Используя такой подход, можно выбрать аминокислотные остатки для замены на цистеины в белке, пространственная структура которого неизвестна. В нашей работе мы использовали пространственную структуру белка Gao из *Mus musculus* (структура в PDB: 3C7K), аминокислотная последовательность которого высоко идентична последовательности белка Gao *D. melanogaster*. Сходство Доменов II (65-180) составляет 76% по результатам выравнивания в программе BLAST, идентичность всей последовательности – 99%.

На рисунке 2 представлена структура белка Gao из *M. musculus*. Синим цветом выделен участок полипептидной цепи, образованный аминокислотными остатками 90-120, который, как предсказывают программы, является неупорядоченным (рисунки 1), и высокоподвижным. Это две сближенные α -спирали (α -шпилька). Пунктирной линией разделены два домена этого белка: домен I — аминокислотные остатки 35–64 и 181–

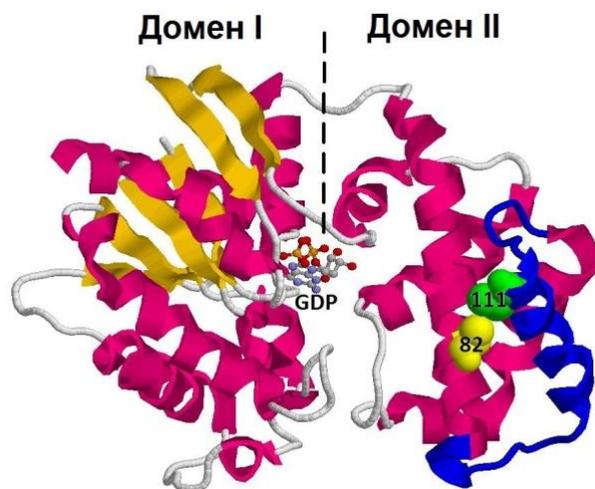


Рис. 2. Пространственная структура белка Gao *M. musculus* (структура 3C7K). Черной пунктирной линией разделены два домена белка Gao. Участок аминокислотной последовательности, предсказанный нативно-развернутым, показан синим цветом. Аминокислотные остатки 82 и 111, между которыми был спроектирован дисульфидный мостик, показаны объемными.

345; домен II — аминокислотные остатки 65–180. Домен I белка Gao связывает молекулу ГДФ (структура показана на рисунке). Аминокислотные остатки 82 и 111, между которыми спроектирован дисульфидный мостик, показаны объёмными. Именно этот участок белка мы решили стабилизировать, «сшив» цистеиновым мостиком две контактирующие α -спирали. Для этого мы выбрали A82 и V111 в белке Gao из *M. musculus*. Поворот и взаимное расположение этих аминокислотных остатков подходят для образования дисульфидной связи.

Сравнение аминокислотных последовательностей белков Gao из *M. musculus* и *D. melanogaster* показало, что в белке Gao из *D. melanogaster* выбранным нами аминокислотным остаткам соответствуют остатки валина в положении 82 и цистеина в положении 111. Таким образом, для введения дисульфидной связи между аминокислотными остатками 82 и 111 достаточно сделать только одну аминокислотную замену — V82C.

1.4. Исследование стабильности белков Gao дикого типа и Gao-V82C

В работе не ставилась задача подробно исследовать белок Gao. Нашей целью было лишь сравнение стабильностей белков Gao дикого типа и его мутантной формы с дисульфидной связью, введенной в участок полипептидной цепи, предсказанный как нативно-развернутый.

Структуры белков Gao дикого типа и мутантной формы Gao-V82C были исследованы методом спектроскопии кругового дихроизма. На рисунке 3 показаны спектры кругового дихроизма белков Gao дикого типа и мутантной формы Gao-V82C в отсутствие восстанавливающих агентов. Видно, что оба спектра совпадают между собой и имеют форму, характерную для α -спиральных белков [Chen, 1974]. В аминокислотной последовательности белка Gao находится 10 остатков цистеинов, 9 из которых располагаются на его поверхности. Взаимодействие остатков цистеинов с восстанавливающими (разрывающими) дисульфидные связи агентами могут быть причиной локальных изменений в структуре белка, которые могут быть отражены в спектрах кругового дихроизма. Этот эффект виден на рисунке 3, где показаны спектры кругового дихроизма для обеих форм белков в восстановленных условиях (в присутствии DTT). Видно, что спектры КД, полученные в таких условиях так же отвечают характеристикам спектров α -спиральных белков, но их интенсивность уменьшилась. Однако спектры белков Gao дикого типа и мутантной формы Gao-V82C не отличаются друг от друга, что говорит о том, что сама по себе мутация не нарушила оригинальную упаковку белка.

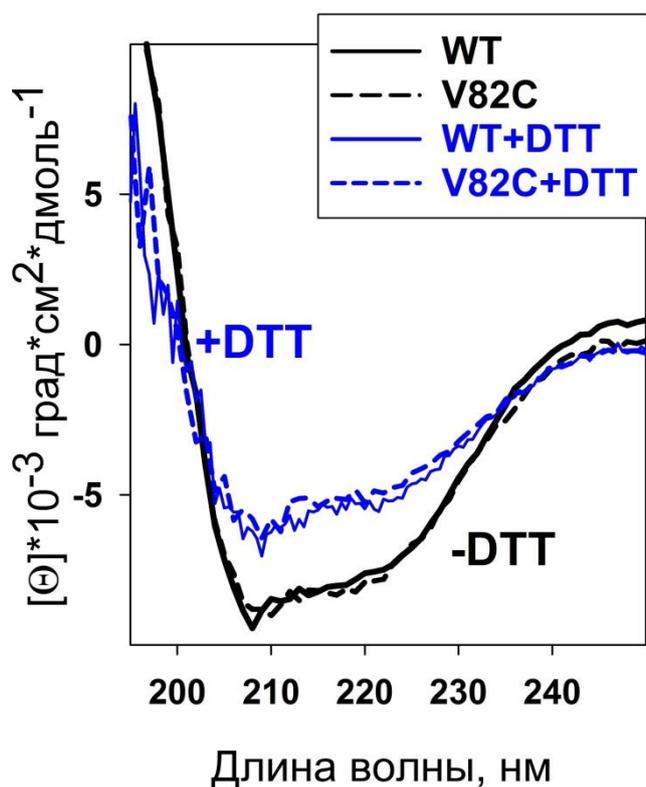


Рис. 3. Спектры кругового дихроизма белка Gaα дикого типа (сплошная линия) и мутантной формы Gaα-V82C (пунктирная линия) при 20°C в присутствии DTT (синим цветом) и в отсутствии DTT (черным цветом) соответственно. Данные получены в условиях 20мМ BISINE (pH=7,5), 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 50 μМ ГДФ.

Температурные переходы Gaα дикого типа и мутантной формы Gaα-V82C были исследованы методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии. На рисунке 4А показаны кривые плавления белка Gaα дикого типа и мутантной формы Gaα-V82C с введенной дисульфидной связью. Кривая плавления белка имеет два максимума, которые, вероятнее всего, связаны с плавлением двух доменов Gaα. На рисунке видно, что положение первого пика плавления совпадает у белка дикого типа и его мутантной формы с дисульфидной связью ($T_{m1} \approx 320$ К), а положение второго пика плавления – отличается. T_{m2} для белка Gaα дикого типа – 329 К, а для мутантной формы Gaα-V82C – 333 К. Данные о процессе тепловой денатурации белка Gaα, полученные методом микрокалориметрии

хорошо согласуются с данными спектроскопии кругового дихроизма. Таким образом, введенная дисульфидная связь стабилизирует один домен белка и повышает температуру его плавления на 4 градуса.

Первый пик плавления Gaα связан с разрушением домена, связывающего молекулу ГДФ (домен I). В отсутствие ГДФ у белка дикого типа (рисунок 4Б) и у белка Gaα-V82C с введенной дисульфидной связью (рисунок 4В) первый пик плавления сдвигается в область меньших температур.

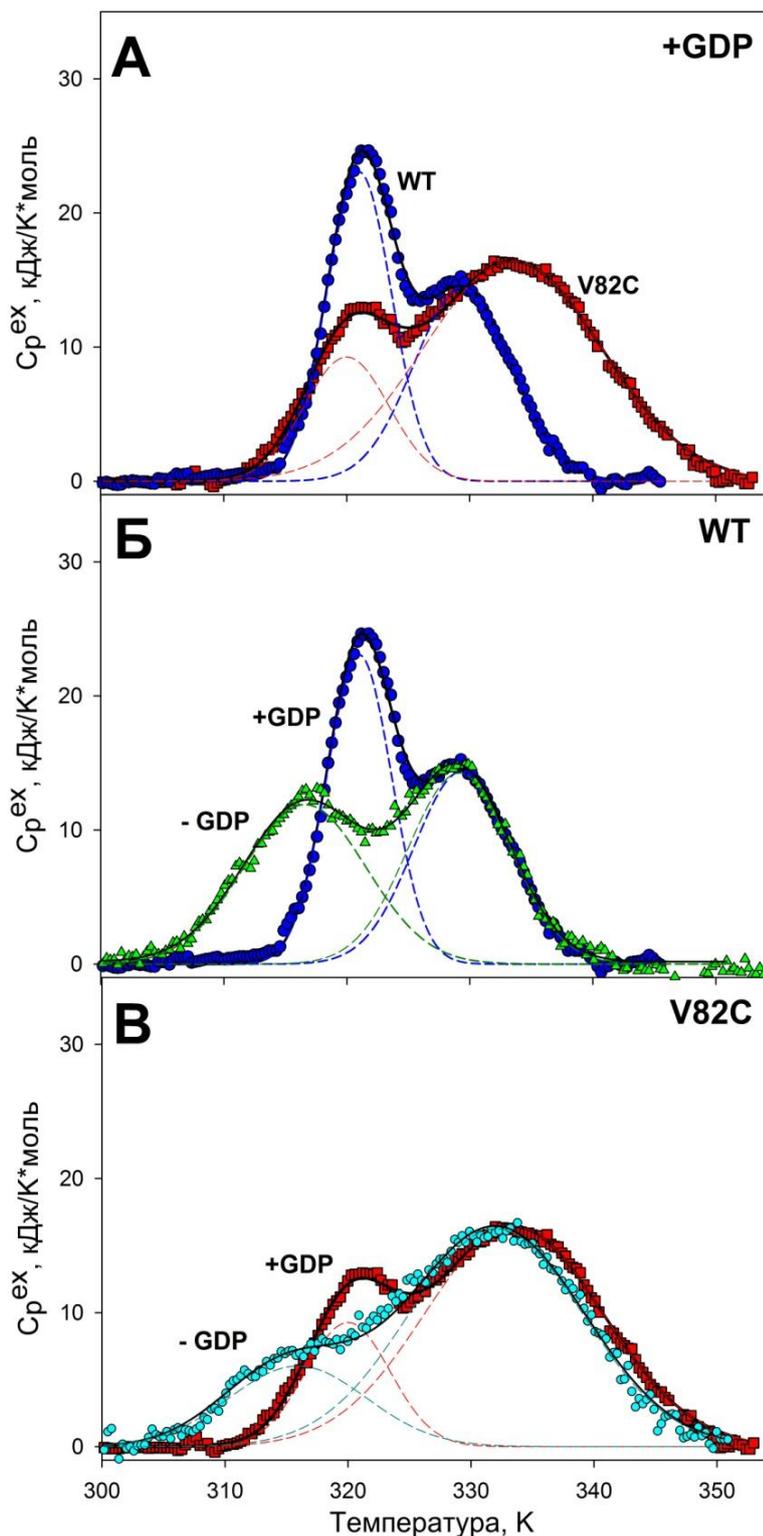


Рис. 4. Зависимость избыточной теплоемкости белка Gaoo от температуры.

а) для белка Gaoo дикого типа (кружочки) и его мутантной формы V82C с введенной дисульфидной связью (квадраты) в присутствии ГДФ.

б) для Gaoo дикого типа в присутствии и в отсутствие ГДФ.

в) для мутантной формы Gaoo (V82C) в присутствии и отсутствие ГДФ. Непрерывной линией на всех графиках, показана подгонка экспериментальных данных, которая проводилась по одностадийной модели, предполагая, что домены Gaoo плавятся независимо. Пунктирной линией показаны кривые плавления отдельных доменов, рассчитанные из подгонки общей кривой плавления.

Измерения проводились в 20мМ BISINE (pH=7,5), 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 50 μM ГДФ.

Скорость прогрева: 1К/мин.

2. Исследование белков L1 из *Haloarcula marismortui* и L1 из *Aquifex aeolicus*

Для более детальной проверки нашей идеи о том, что для стабилизации структуры белков необходимо вводить дисульфидные связи в ослабленные участки белка, которые предсказываются как нативно-развернутые, необходимо убедиться, что основным параметром, влияющим на стабилизацию белка при

введении мутации, является именно предсказанная ослабленность участка полипептидной цепи белка, а не особенности вторичной или третичной структуры.

Для этого необходимо исследовать два белка, одинаковых по структуре, но достаточно сильно отличающихся по аминокислотной последовательности. Одинаковая структура дает нам возможность вводить мутации в одинаковые участки белка с одинаковой вторичной структурой. Разная аминокислотная

последовательность дает нам разное предсказание неупорядоченности аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Поэтому, введение одинаковых замен в одинаковые участки структуры белка с разным предсказанием нативно-развернутости позволит нам избавиться от контекста вторичной структуры участка, в который вводится дисульфидная связь, а оценить влияние дисульфидной связи конкретно на участок, предсказанный неупорядоченным или структурированным.

Объектами для такого исследования были выбраны рибосомные белки L1 из галофильной археи *Haloarcula marismortui* (**HmaL1**) и L1 из экстремофильной бактерии *Aquifex aeolicus* (**AaeL1**). Структура AaeL1 известна [Nikonova, 2007], для белка HmaL1 структура была смоделирована [Gabdulkhakov, 2017]. Оба эти белка имеют характерную для рибосомных белков L1 структуру, в которой можно выделить два домена, соединенные двухтяжевой междоменной перетяжкой. N- и C- концы белка располагаются в домене I, который отвечает за связывание 23S-рРНК. Домен II участвует в процессе узнавания рРНК [Gabdulkhakov, 2017]. Особенность этих белков заключается в том, что они различаются по своей аминокислотной последовательности (идентичность 33%), но схожи по пространственной структуре.

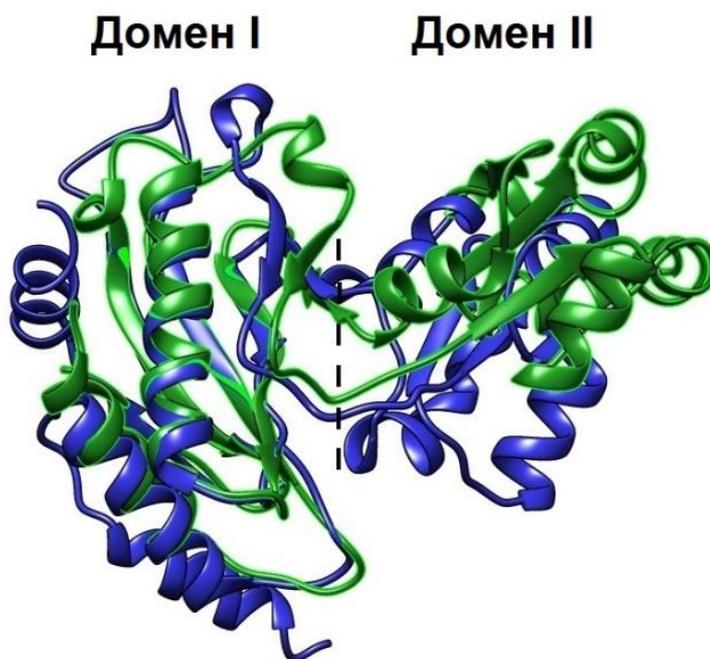


Рис. 5. Наложение пространственных структур белка AaeL1 (синим) и HmaL1 (зеленым). Пунктирной линией разделены домены I и II.

Далее мы остановимся на анализе домена II этих белков, поскольку предсказания нативно-развернутости этих доменов отличаются для двух исследуемых белков: в белке HmaL1 домен II предсказывается как нативно-развернутый, а в белке AaeL1 – как частично структурированный. Поэтому дизайн мутаций во втором домене белков L1 позволит сравнить влияние введения дисульфидных связей в одинаковых структурных элементах на белки с одинаковой структурой, но с разным аминокислотным составом, и потому с разной предрасположенностью быть нативно-развернутыми.

2.1. Сравнение пространственной структуры и аминокислотных последовательностей белков AaeL1 и HmaL1

Пространственная структура рибосомных белков L1 отличается высокой консервативностью. На рисунке 5 представлено наложение пространственной структуры белка AaeL1 (синим) и модели пространственной структуры белка HmaL1 (зеленым). Оба этих белка имеют характерную для белков L1 двухдоменную структуру: N- и C- концы расположены в домене I, который связан двухцепочечной перетяжкой с доменом II.

Видно, что основные элементы вторичной структуры домена I двух белков хорошо накладываются друг на друга. При сравнении структур двух белков видно характерное различие архейных и бактериальных белков L1, заключающееся в разном повороте домена II относительно домена I. Однако если отдельно сравнить структуры доменов II, мы так же увидим их хорошее наложение (рисунок 6Б). Сравнение аминокислотных последовательностей белков, выполненное в программе BLAST [Jones, 2003] показало, что идентичность аминокислотных последовательностей белков AaeL1 и HmaL1 составляет 33%.

2.2. Поиск неупорядоченных участков и дизайн дисульфидных связей в белках AaeL1 и HmaL1

Поиск неупорядоченных участков в последовательностях белков проводился с помощью программ PONDR-FIT и IsUnstruct [Xue, 2010], [Lobanov, 2013]. На рисунке 6А показана вероятность разных аминокислотных остатков белков AaeL1 (синим цветом) и HmaL1 (зеленым цветом) быть в нативно-развернутом состоянии. Данные получены программами PONDR-FIT (сплошной линией) и IsUnstruct (пунктирной линией). Вертикальными линиями выделен участок аминокислотной последовательности, относящийся к домену II этих белков. В этом домене мы видим большую разницу в предсказаниях программ (участок выделен красным отрезком внизу графика). Для белка

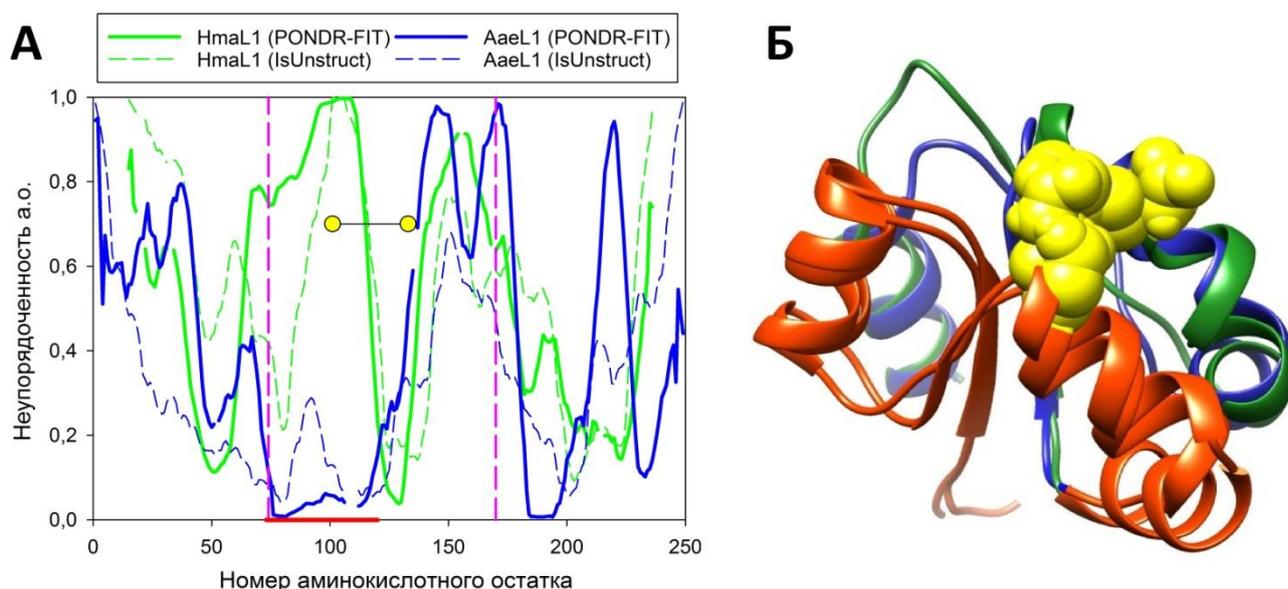


Рис. 6. Дизайн дисульфидных связей в белках AaeL1 и HmaL1.

А – вероятности аминокислотных остатков в белках HmaL1 (зеленые линии) и AaeL1 (синие линии) быть неупорядоченными, предсказанные с помощью программ POND-R-FIT (сплошными линиями) и IsUnstruct (пунктирными линиями). Вертикальными линиями выделены участки белков, образующие домен II. Красной линией внизу графика показан участок последовательности, в котором предсказания неупорядоченности участков для белков AaeL1 и HmaL1 различаются. Желтыми кружками показаны позиции для введения SS-связей.

Б – наложение пространственных структур доменов II белка AaeL1 и HmaL1. Синим цветом окрашен участок полипептидной цепи белка AaeL1, предсказанный программами POND-R-FIT и IsUnstruct как структурированный. Зеленым цветом окрашен участок полипептидной цепи белка HmaL1, предсказанный как неупорядоченный. Желтым цветом и объемом выделены аминокислотные остатки D101 и K127 в белке AaeL1 и E82 и D114 в белке HmaL1, выбранные нами для замены на остатки цистеинов.

AaeL1 этот участок предсказывается как структурированный, в то время как для белка HmaL1 этот участок предсказывается как неупорядоченный.

Именно такой участок подходит для проверки нашей идеи. Если результат работы программ типа POND-R-FIT и IsUnstruct действительно можно интерпретировать как предсказание «стабильных» и «ослабленных» частей полипептидной цепи белка, тогда введение дисульфидной связи в участок, предсказанный как неупорядоченный, найденный в HmaL1, приведет к повышению стабильности и уменьшению подвижности этого белка, а введение дисульфидной связи в такой же участок, но предсказанный как структурированный в AaeL1, не изменит стабильность белка, или даже уменьшит ее. Если более важным для стабилизации белка является его пространственная структура, то введенные мутации одинаковым образом должны повлиять на оба белка.

На рисунке 6Б показано наложение пространственных структур доменов II белков AaeL1 и HmaL1. В них синим и зеленым цветами соответственно показаны участки аминокислотных последовательностей белков, выбранных нами для введения дисульфидных связей исходя из предсказаний, выполненных программами PONDR-FIT и IsUnstruct. Желтым цветом и объемом показаны аминокислотные остатки, выбранные нами для замены на остатки цистеинов.

Ими оказались D101 и K127 в белке AaeL1 и E82 и D114 в белке HmaL1. Выбор аминокислотных остатков для замены на остатки цистеинов проводился по двум критериям: расстояние между C β -атомами аминокислотных остатков должно быть $\sim 5\text{\AA}$ и остатки в пространстве должны быть направлены друг на друга.

2.4. Исследование стабильности белка AaeL1 с введенной дисульфидной связью

Прежде чем исследовать влияние введенной дисульфидной связи на стабильность белка AaeL1, необходимо проверить, не нарушили ли введенные замены нативную упаковку белка. На рисунке 7А показаны спектры кругового дихроизма, полученные для белка AaeL1 дикого типа и мутантной формы с завязанной дисульфидной связью. Из рисунка видно, что формы спектров

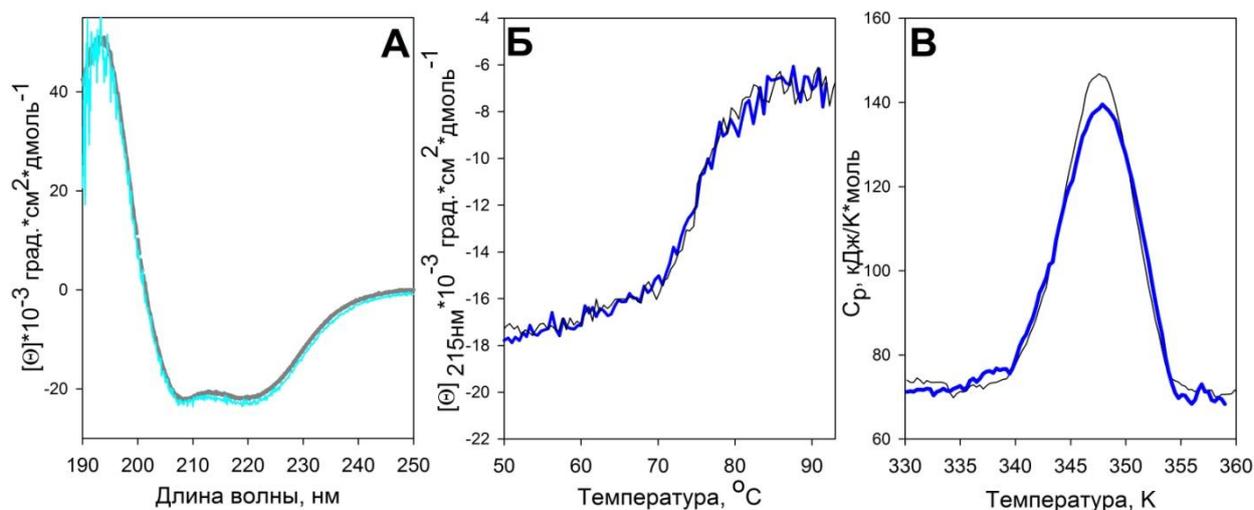


Рис. 7. Исследование стабильности белков AaeL1 дикого типа и AaeL1-D101C-K127C

А – спектры кругового дихроизма белка AaeL1 дикого типа (серым цветом) и мутантной формы с введенной дисульфидной связью AaeL1-D101C-K127C (голубым цветом)

Б – температурная зависимость молярной эллиптичности на 215 нм – для белка AaeL1 дикого типа (черным цветом) и белка AaeL1-D101C-K127C (синим цветом) от температуры.

В – зависимости парциальной теплоемкости белка AaeL1 дикого типа (черным цветом) и AaeL1-D101C-K127C с завязанной дисульфидной связью (синим цветом) от температуры.

Измерения проводились в 20 мМ натрий-фосфатном буфере (pH=7,5) и присутствии 4 М мочевины. Скорость прогрева: 1°C/мин.

белков дикого типа и мутантной формы хорошо совпадают и характерны для α -спиральных белков. Таким образом, можно сделать вывод, что введенная дисульфидная связь в белке AaeL1 не нарушила вторичную структуру белка. Процесс плавления белка AaeL1 и AaeL1-D101C-K127C был исследован методом спектроскопии кругового дихроизма. На рисунке 7Б показаны кривые зависимости интенсивности молярной эллиптичности на длине волны 215 нм от температуры. Видно, что кривые для белка AaeL1 дикого типа и мутантной формы с введенной дисульфидной связью AaeL1-D101C-K127C совпадают. Для уточнения температуры плавления белков AaeL1 дикого типа и AaeL1-D101C-K127C мы исследовали процессы плавления этих белков методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии. На рисунке 7В показаны кривые плавления белка AaeL1 и его мутантной формы с введенной дисульфидной связью в присутствии 4 М мочевины. Видно, что для белка дикого типа и для белка с введенной дисульфидной связью температура плавления совпадает и составляет 347К.

2.5. Исследование стабильности белка HmaL1 с введенной дисульфидной связью

Исследование влияния введенной дисульфидной связи на структуру белка HmaL1 проводилось с использованием метода спектроскопии кругового дихроизма. На рисунке 8А показаны спектры КД белков HmaL1 дикого типа (темно-зеленым) и его мутантной формы с завязанной дисульфидной связью HmaL1-E82C-D114C (зеленым). Видно, что дисульфидная связь, введенная в неупорядоченный участок белка, уменьшила количество неупорядоченной структуры в белке. Методом спектроскопии кругового дихроизма был исследован процесс плавления белков HmaL1. На рисунке 8Б показан график зависимости доли нативного состояния белка HmaL1 дикого типа и мутантной формы с завязанной и разорванной дисульфидной связью HmaL1-E82C-D114C, рассчитанной из интенсивности молярной эллиптичности на 215 нм, от температуры.

Видно, что белок HmaL1 дикого типа плавится в районе 55 градусов, в то время как белок HmaL1-E82C-D114C с завязанной дисульфидной связью плавится при 65 градусах. Это подтверждает нашу гипотезу о том, что дисульфидная связь, введенная в участок, предсказанный как неупорядоченный (не смотря на то, что в структуре этого белка он структурирован), приводит к повышению стабильности белка.

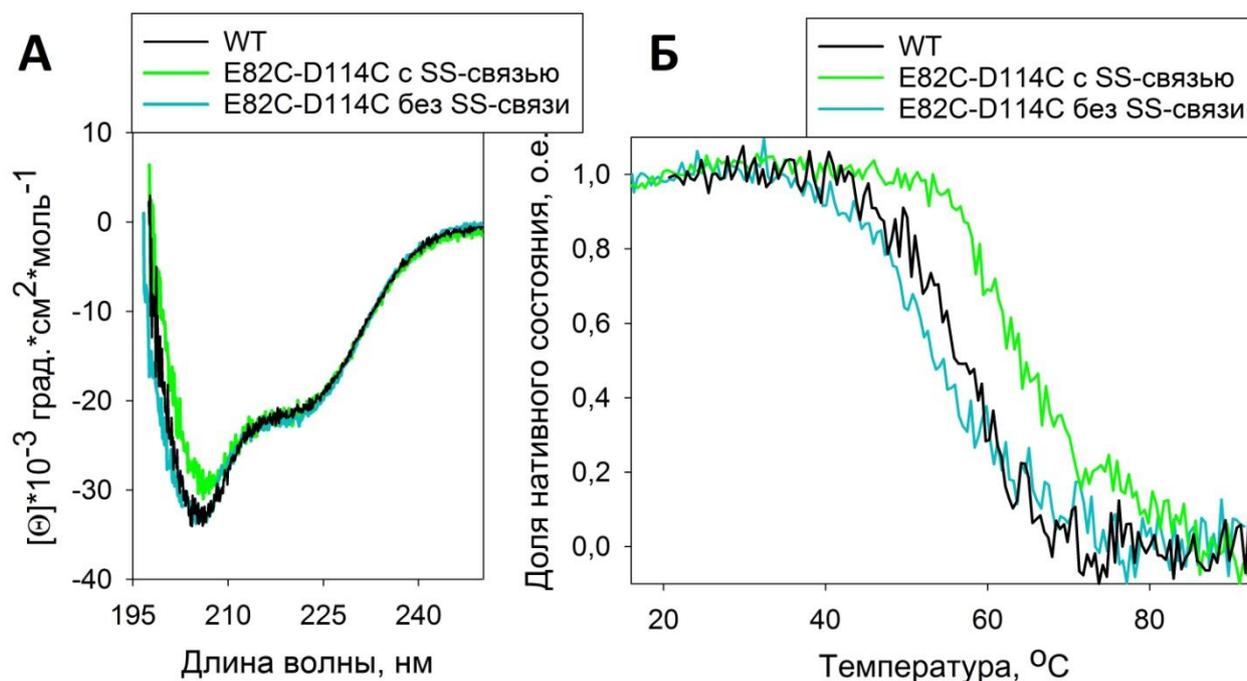


Рис. 8. Исследование стабильности белка HmaL1 дикого типа и HmaL1-E82C-D114C.

А – Спектры кругового дихроизма белка HmaL1 дикого типа (черным цветом), HmaL1-E82C-D114C с завязанной дисульфидной связью (зеленым цветом) и с разорванной дисульфидной связью (голубым цветом)..

Б – Зависимость доли нативного состояния белка HmaL1 дикого типа (черным цветом), HmaL1-E82C-D114C с завязанной (зеленым цветом) и с разорванной (голубым цветом) дисульфидной связью от температуры. Доля нативного состояния белка рассчитывалась из величины молярной эллиптичности на 215 нм.

Измерения проводились в 50 мМ Трис-НСl (рН=7,5), 3М NaCl, 50 мМ MgCl $_2$. Скорость прогрева: 1°C/мин.

Белок L1 – высоко консервативный рибосомный белок, который связывается с 23S рРНК. Проверка биологической функции стабилизированной мутантной формы белка HmaL1-E82C-D114C, подробно описанная в полном тексте диссертации, показала, что введенная дисульфидная связь не нарушила функцию белка.

3. Заключение

В результате исследования разработан и систематически проверен новый подход к увеличению стабильности структуры глобулярных белков, основанный на расчетах программ, предсказывающих нативно-развернутые участки белков по их аминокислотной последовательности. Стабилизацию белков в этой работе мы осуществляли путем введения дисульфидных связей.

Результаты наших исследований позволяют высказать предположение, что выбор участка для введения стабилизирующих структуру белка мутаций определяется не столько особенностями его пространственной упаковки,

сколько особенностями аминокислотного состава на данном участке полипептидной цепи белка. Выполненные нами исследования подтверждают, что программы по предсказанию нативно-развернутых участков можно использовать как инструмент для поиска «ослабленных» частей белка, которые, в свою очередь, потенциально могут быть причиной существования более подвижных, нестабильных промежуточных состояний и, соответственно, влиять на переход между нативным и другими состояниями при плавлении или разворачивании белка денатурантами.

ВЫВОДЫ

1. Результаты расчетов программ, предсказывающих нативно-развернутые участки полипептидной цепи (PONDR-FIT и IsUnstruct), для глобулярных структурированных белков можно интерпретировать как предсказание «ослабленных» участков, стабилизация которых может повлиять на стабильность белка в целом.

2. Закрепление дисульфидной связью (V82C-111C) предсказанного «ослабленным» участка белка Gao привело к повышению стабильности его структуры на 4°C при тепловой денатурации.

3. Закрепление дисульфидной связью (D101C-K124C) предсказанного «не ослабленным» участка белка AaeL1 никак не повлияла на стабильность его структуры.

4. Закрепление дисульфидной связью (E82C-D114C) предсказанного «ослабленным» участка белка HmaL1 привело к повышению стабильности его структуры на 10°C при тепловой денатурации и не нарушило функцию белка.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1) Nagibina GS, Tin UF, Glukhov AS, Melnik TN, Melnik BS. Intrinsic Disorder-Based Design of Stabilizing Disulphide Bridge in Gao Protein. // Protein & Peptide Letters. 2016. V. 23, No. 2. P. 176-184.

2) Нагибина Г.С., Джус У.Ф., Глухов А.С., Мельник Т.Н., Мельник Б.С. Метод стабилизации белков, основанный на предсказании нативно-развернутых участков. Стабилизация белка Gao. // Вестник СПбГУ. 2016. Т. 3, № 61. С. 288-295.

3) Нагибина Г.С., Марченков В.В., Глухова К.А., Мельник Т.Н., Мельник Б.С. Проверка подхода к созданию стабильных форм белков, основанного на предсказании нативно-развернутых участков, на примере рибосомных белков L1. // Биохимия. 2020. Т. 85, № 1, с. 104-115.

4) Nagibina G., Glukhova K., Uversky V., Melnik T., Melnik B. Intrinsic Disorder-Based Design of Stable Globular Proteins. // *Biomolecules*. 2020. V. 10, No. 64. P. 1-18.

5) Нагибина Г.С., Мельник Б.С. Исследование влияния дисульфидной связи на стабильность структуры белка L1. // *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. 2018. Т. 3, № 4. С. 863-869.

6) Nagibina G., Tin U., Glukhov A., Melnik T., Melnik B. Stabilization of one domain of protein Gao by introduction of a cysteine bridge. / *40th FEBS CONGRESS The Biochemical Basis of Life*, Germany, Berlin, 4-9 July 2015, FEBS Journal. 2015. V. 282, No. 1. p. 331-332.

7) Nagibina G., Tin U., Glukhov A., Melnik T., Melnik B. Design and Study of Stabilizing Disulphide Bridge of Gao Protein. / *Biophysics. Biophotonics. Biotechnology*. Russia, Moscow, 16-17 February 2016, Conference abstracts, p. 15.

8) Нагибина Г.С., Тин У.Ф., Глухов А.С., Мельник Т.Н., Мельник Б.С. Метод стабилизации белков, основанный на предсказании нативно-развернутых участков. Стабилизация белка Gao. / *IV конференция «Современные проблемы молекулярной биофизики»*, Россия, Санкт-Петербург, 14-15 июня 2016 года. Сборник тезисов, с. 34-35.

9) Нагибина Г.С., Джус У.Ф., Глухов А.С., Мельник Т.Н., Мельник Б.С. Повышение устойчивости к температурной денатурации одного из доменов белка Gao путем введения дисульфидной связи. / *Молодежный научный форум «OpenScience 2016»*, Россия, Гатчина, 16-18 ноября 2016 года. Сборник тезисов, с. 9.

10) Нагибина Г.С., Мельник Б.С. Проектирование стабилизирующей дисульфидной связи в белке L1. / *22-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых «Биология Наука XXI века»*, Россия, Пушкино, 23-27 апреля 2018 года. Сборник тезисов, с. 145.

11) Нагибина Г.С., Мельник Б.С. Использование программ, предсказывающих нативно-развернутые участки, для дизайна стабильных форм белков. / *Третья международная конференция со школой молодых ученых «Физика – наукам о жизни»*, Россия, Санкт-Петербург, 14-18 октября 2019 года. Сборник тезисов, с. 68.

12) Нагибина Г.С., Мельник Б.С. Исследование влияния дисульфидной связи на стабильность структуры белка – на примере белков L1 из *Haloarcula marismortui* и L1 из *Aquifex aeolicus*. / *XIV Международная научная конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии»*. БФФХ-2019», Россия, Москва, 21-24 ноября 2019 года. Сборник тезисов, с. 66.