

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ N- И C-КОНЦЕВЫХ ДОМЕНОВ ПРИ АВТОИНГИБИРОВАНИИ И АКТИВАЦИИ ФОРМИНА mDial

© 2015 г. И.А. Оршанский, А.В. Попинако\*, А.Д. Коромыслова\*\*,  
О.И. Волох\*\*\*, К.В. Шайтан\*\*\* \*\*\*\*, О.С. Соколова\*\*\*

ЗАО «Байер», 107113, Москва, 3-я Рыбинская ул., 18/2;

\*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33/2;

\*\*Университет Гейдельберга, 69117, Гейдельберг, Грабенгассе, 1, Германия;

\*\*\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/12;

\*\*\*\*Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: sokolova184@gmail.com

Поступила в редакцию 07.04.15 г.

Методом управляемой молекулярной динамики были определены пары аминокислотных остатков на поверхности взаимодействующих доменов формина mDial: DID-DAD, контролирующих автоингибирование формина и DID с ГТФазой Rho, отвечающих за активацию. Наиболее стабильными являются ионные взаимодействия между остатками Glu178 и Arg248, а также гидрофобные взаимодействия атома углерода Thr175 с ароматическим кольцом Phe247. Взаимодействия DID с Rho оказались наиболее сильными. Они опосредованы специфическими тройными ионными взаимодействиями между положительно заряженными аминокислотами из Rho и триплета аминокислот в составе домена DID, состоящего из двух отрицательно заряженных аминокислот, разделенных одной незаряженной. Сайты связывания домена DID с Rho и DAD частично перекрываются, но во взаимодействиях с различными партнерами принимают участие различные аминокислоты DID. Обсуждаются возможные конформационные изменения доменов формина при активации и инактивации.

*Ключевые слова:* актинсвязывающие белки, формин, молекулярная динамика, DID, DAD, Rho-ГТФаза.

Многие клеточные процессы, такие как перемещение клеток, цитокинез, поддержание полярности клетки, везикулярный транспорт, морфология и иммунные реакции происходят благодаря работе актинового цитоскелета [1,2]. Актиновые филаменты – это полярные структуры, характеризующиеся быстрорастущим оперенным концом и медленно растущим заостренным концом. Рост филаментов регулируется внеклеточными раздражителями, которые активируют сигнальный каскад реакций. К таким сигнальным молекулам относится Rho-ГТФаза (Rho).

В данном исследовании изучали работу ключевого актинсвязывающего белка формина mDial, контролирующего формирование *de novo* актиновых филаментов. В клетке формин находится в автоингибированном состоянии [3,4]. Автоингибирование обусловлено внутримолекулярными взаимодействиями между N-

концевым регуляторным участком формина: Diaphanous Inhibitory Domain (DID) и его консервативным C-концевым сегментом, называемым Diaphanous Autoregulatory Domain (DAD) [5,6]. Автоингибирование было продемонстрировано в экспериментах по совместной экспрессии изолированных N- и C-концевых фрагментов молекулы формина [5,7,8].

Активация формина происходит при связывании Rho-ГТФазы с GBD-доменом формина [5,8,9]. С помощью ЯМР и биохимических экспериментов было выявлено, что области контактов DID-Rho и DID-DAD частично перекрываются, что позволило предположить наличие механизма конкурентного связывания [7,10]. В результате связывания с Rho формин изменяет свою конформацию и пространственное расположение доменов таким образом, что оказывается возможным взаимодействие формина с мономерами актина и формирование полимерной цепи актина [11]. Ранее Отото и Роуз с соавторами получили кристаллическую

Сокращения: Rho – Rho-ГТФаза; МД – молекулярная динамика; УМД – управляемая молекулярная динамика.

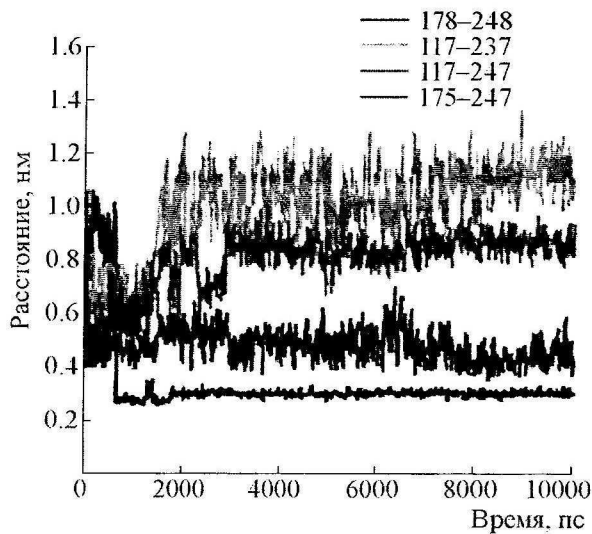


Рис. 1. Молекулярная динамика DID-DAD-комплекса в течение 10 нс. Расстояния между парами остатков на поверхности взаимодействия DID-DAD.

структуру изолированного N-терминального участка DID [9], а также его структуру в составе комплекса с Rho [10]. Однако в кристаллической структуре возможно искаженное расположение некоторых поверхностных аминокислот, обусловленное упаковкой белка в кристаллической решетке. Следовательно, свойства междоменных взаимодействий, определяемые поверхностными аминокислотами, представляют собой особый интерес для молекулярного моделирования и проведения численных экспериментов.

Таким образом, предметом данного исследования явилось взаимодействие в комплексах DID-DAD и DID-Rho и роль специфических аминокислот на взаимодействующих поверхностях. Методом молекулярной динамики (МД) исследована роль отдельных аминокислотных остатков в составе доменов формина: DID и DAD, участвующих в образовании стабильных комплексов при автоингибировании и активации формина с помощью Rho-ГТФазы. Была проведена оценка стабильности комплексов, выделены предполагаемые типы взаимодействий.

## МЕТОДЫ

**Объекты исследования.** Кристаллическая структура комплекса DID-Rho мыши (pdb code: 1Z2C), кристаллическая структура комплекса DID-DAD мыши (pdb code: 1F31).

**Молекулярная динамика.** *Параметры метода.* Для расчетов использовали программный пакет Gromacs 3.3, силовое поле OPLS-AA/L.

Расчетная длина траектории 10 нс (1 нс для релаксации), шаг интегрирования — 1 фс. Расчеты проводили в периодической ячейке при использовании стохастической динамики в качестве термостата (поддерживаемая температура 300 K). Алгоритм расчета — Leapfrog.

**Релаксация.** Источником начальных структур являлись молекулярные структуры, полученные методом кристаллографии (pdb code: 1F31 для структуры комплекса DID-DAD и 1Z2C для структуры комплекса DID-Rho). Исходная структура изначально релаксировалась. К отрелаксированной структуре применяли управляемую молекулярную динамику (УМД).

**Управляемая молекулярная динамика.** Данный метод применяли для оценки прочности взаимодействия между доменами, а также определения ключевых точек для взаимодействия.

В протоколе УМД центр масс домена DID фиксировали, а к центру домена масс DAD или Rho применяли силу, направленную по нормали к плоскости контакта доменов. Сила была постоянной в каждом эксперименте. Между сериями экспериментов сила увеличивалась с шагом 70 ккал/(моль·Å).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Взаимодействия в комплексе DID-DAD.** На первом этапе проводили МД в течение 1 нс для релаксации кристаллической структуры мышинового комплекса DID-DAD, полученной из базы данных белковых структур Protein Data Bank (pdb code 1F31). После релаксации анализировали образование устойчивых ионных и гидрофобных взаимодействий между отдельными аминокислотами. Было выделено четыре пары аминокислотных остатков, взаимодействие между которыми стабилизировало комплекс DID-DAD: A117<sub>DID</sub>-F247<sub>DAD</sub>; A117<sub>DID</sub>-L237<sub>DAD</sub>; E178<sub>DID</sub>-R248<sub>DAD</sub>; T175<sub>DID</sub>-F247<sub>DAD</sub>. Данные аминокислотные остатки находились друг от друга на расстоянии менее 1 нм.

С помощью метода МД проводили численный эксперимент, затем на основании полученной траектории оценивали изменение расстояния между аминокислотными остатками (рис. 1). Согласно полученным данным наиболее сильные взаимодействия наблюдали между E178<sub>DID</sub> и R248<sub>DAD</sub>, T175<sub>DID</sub> и F247<sub>DAD</sub>, A117<sub>DID</sub> и F247<sub>DAD</sub>. При этом E178<sub>DID</sub> и R248<sub>DAD</sub> образуют ионную связь, а A117<sub>DID</sub>-F247<sub>DAD</sub> и T175<sub>DID</sub>-F247<sub>DAD</sub> определены гидрофобными взаимодействиями.

Для исследования роли отдельных аминокислот в стабилизации DID-DAD поверхности

мы применили УМД. Центр масс домена DID фиксировали, и к центру масс домена DAD прилагали различные силы. Приложение сил величиной 1–70 ккал/(моль·Å) показало отсутствие существенного увеличения расстояния между центрами масс DID- и Rho-доменов (данные не представлены). Критическое значение приложенной силы было достигнуто уже при 80 ккал/(моль·Å): комплекс DID-DAD полностью диссоциировал после 1,3 нс УМД (рис. 2). Были выделены аминокислоты, участвующие в междоменном взаимодействии при значительных конформационных изменениях DAD-домена E178<sub>DID</sub>-R248<sub>DAD</sub>, T175<sub>DID</sub>-F247<sub>DAD</sub>.

**Взаимодействия в комплексе DID-Rho.** При исследовании кристаллической структуры комплекса DID-Rho из mDial (pdb code 1Z2C) [10] были показаны следующие пары взаимодействующих аминокислот: Y66<sub>Rho</sub>-K108<sub>GBD</sub>; Q63<sub>Rho</sub>-K108<sub>GBD</sub>; V38<sub>Rho</sub>-P103<sub>GBD</sub>; E40<sub>Rho</sub>-K107<sub>GBD</sub>; D67<sub>Rho</sub>-N164<sub>DID</sub>; D67<sub>Rho</sub>-N165<sub>DID</sub>. С применением метода МД было показано, что наиболее стабильные взаимодействия формируются между следующими парами остатков: D67<sub>Rho</sub>-N164<sub>DID</sub>, E40<sub>Rho</sub>-K107<sub>GBD</sub>, V38<sub>Rho</sub>-P103<sub>GBD</sub> (рис. 3). Следовательно, основу формирования DID-Rho-комплексов составляют гидрофобные и ионные взаимодействия.

Метод УМД применяли для исследования взаимодействий между специфическими аминокислотными остатками, стабилизирующими комплекс по принципу «молекулярных замков». При этом фиксировали центр масс DID-домена и силы различной величины прикладывали к центру масс Rho. Взаимодействие между доменом DID и ГТФазой Rho оказалось значительно сильнее, чем между доменами DID и DAD. Приложение сил от 1 до 399 ккал/(моль·Å) не показало существенного увеличения расстояния между центрами масс домена DID и Rho (данные не представлены). Приложение силы 400–500 ккал/(моль·Å) позволило определить два ключевых участка, где взаимодействия были наиболее сильными. В каждом из них были впервые отмечены тройные ионные взаимодействия.

Первый ключевой участок образован в результате взаимодействия положительно заряженного K133<sub>Rho</sub> и отрицательно заряженных E427<sub>DID</sub> и E429<sub>DID</sub>. Во втором ключевом участке ионное взаимодействие формируют положительно заряженный R68<sub>Rho</sub> и отрицательно заряженные N253<sub>DID</sub> и N255<sub>DID</sub> (рис. 4).

Данные тройные комплексы, согласно данным УМД, являются наиболее стабильными и взаимодействуют на протяжении достаточно

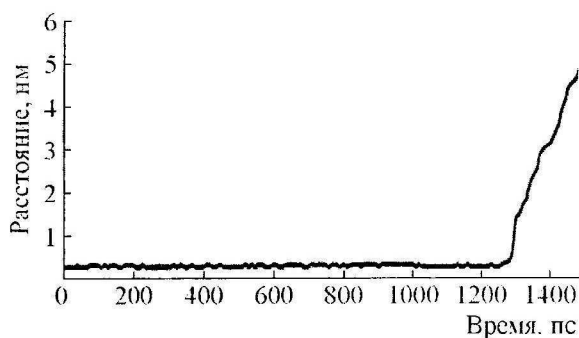


Рис. 2. Расстояние между DID-DAD-доменами при приложении силы 80 ккал/(моль·Å).

долгого времени, после того как все остальные взаимодействия диссоциируют (рис. 5).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Специфическое взаимодействие N-концевого домена формина DID с его C-концевым доменом DAD при автоингибировании считается широко известным фактом, однако механизм взаимодействия является предметом дискуссий. Ламмерс с коллегами [7] предположили, что аминокислотные остатки DAD F247 и M234 являются ключевыми и приносят основной вклад во взаимодействие с DID. МД-исследование подтвердило роль F247<sub>DAD</sub> – остаток гидрофобно взаимодействует с T175<sub>DID</sub> и с A117<sub>DID</sub>. Однако мы не выявили участия M234<sub>DAD</sub> во взаимодействии с DID. Дополнительно мы определили еще одну пару взаимодействующих аминокислот: E178<sub>DID</sub> и R248<sub>DAD</sub>. На основании сравнения стабильности структур в экспериментах по УМД можно сделать вывод, что комплекс DID-DAD является менее стабильной структурой, что соответствует экспериментальным данным, демонстрирующим быстрый распад комплекса DID-DAD при активации молекулы формина [3,4].

В отличие от ингибиторного комплекса DID-DAD, взаимодействия DID с активатором Rho значительно сильнее. Поуз с коллегами на основе анализа кристаллической структуры DID-Rho предположили, что основную роль в образовании комплекса играют гидрофобные взаимодействия [10]. Наши эксперименты по УМД показали, что основные контакты, стабилизирующие структуру DID-Rho, образованы тройными взаимодействиями, имеющими электростатическую природу. Каждое такое взаимодействие включает три аминокислоты: положительно заряженную из Rho (K или R), взаимодействующую с триплетом аминокислот в составе домена DID, состоящего из двух заря-

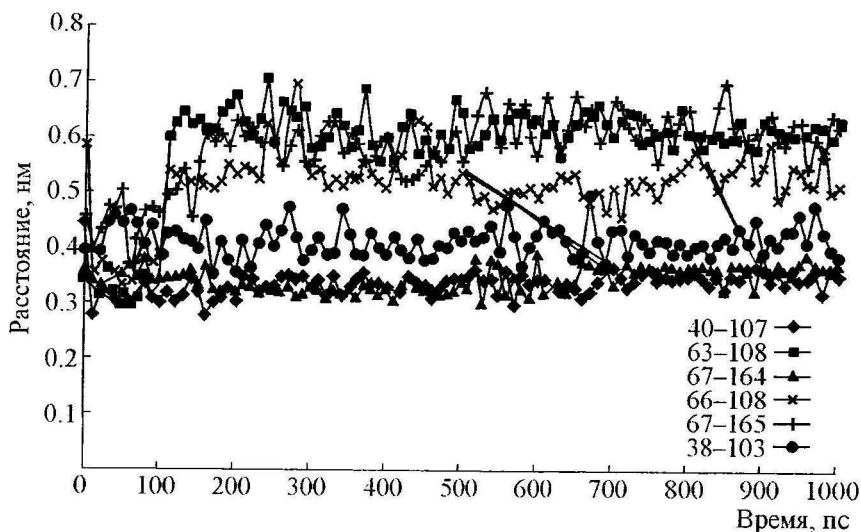


Рис. 3. Молекулярная динамика DID-Rho-комплекса в течение 10 нс. Расстояния между парами остатков на поверхности взаимодействия DID-Rho.

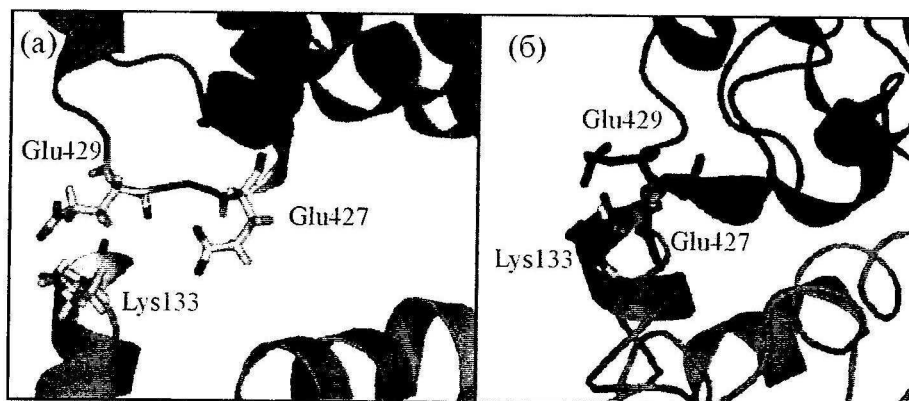


Рис. 4. Образование тройного ионного взаимодействия на поверхности взаимодействия DID и Rho. (а) – Кристаллическая структура комплекса DID-Rho до релаксации, (б) – после релаксации в течение 10 нс (взаимодействующие спирали доменов: DID – сверху, Rho – снизу).

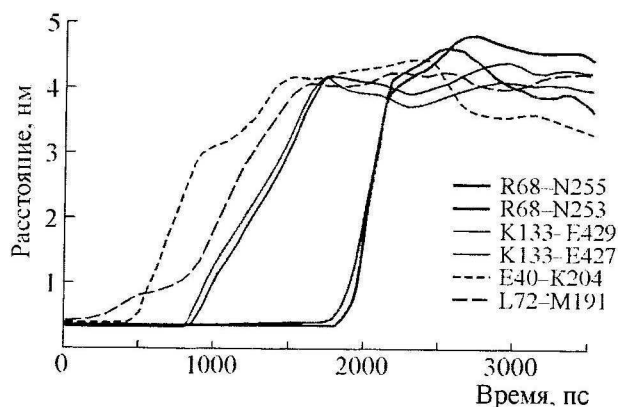


Рис. 5. Изменение расстояния между парами остатков на поверхности взаимодействия Rho и DID при приложении силы 400 ккал/(моль·Å). Тройные взаимодействия отмечены непрерывными линиями.

женных аминокислот (N или E), разделенных незаряженной (X) – NXN или EXE. Такие взаимодействия оказались очень прочными и нарушить их можно только при приложении силы, превышающей физиологические значения. Возможной причиной является формирование стабильных ионных комплексов, которые взаимодействуют сильнее, чем пары аминокислотных остатков. Было бы интересно в дальнейшем проследить формирование подобных комплексов на контактирующих поверхностях других белок-белковых комплексов.

Имеющаяся на сегодняшний день рабочая гипотеза физиологического обновления формина в клетке [3] предполагает, что в цитоплазме он находится в автоингибированном состоянии. Для того чтобы перевести его в активное состояние, необходимо взаимодействие с факто-

рами, способствующими нуклеации, Rho ГТФ-азой и липидами [5,8,9].

Сайты связывания DID с RhoA и DAD значительно перекрываются [5]. Наши исследования показали, однако, что во взаимодействии с различными доменами принимают участие разные аминокислоты DID. Это означает, что при активации формина Rho может вначале взаимодействовать с GBD, а потом конкурирующие взаимодействия вытесняют домен DAD, и его сайт связывания оккупируется Rho, что приводит к стабильному активированному состоянию. Это состояние фиксируется тройными ионными взаимодействиями (рис. 4б). В результате формин переходит в открытую конформацию; его актинсвязывающие сайты становятся доступны, это инициирует нуклеацию нового актинового филамента. Предполагается, что формин при этом может остаться связанным с плазмалеммой через Rho ГТФазу [12]. Подобная схема требует очень сильных взаимодействий для того, чтобы удержать растущий актиновый филамент. Обнаруженные нами в настоящем исследовании тройные ионные взаимодействия прекрасно справляются с подобной задачей. Для разрыва тройных взаимодействий формин должен претерпеть конформационное изменение, при этом взаимодействующие аминокислоты могут оказаться в положении, характерном для кристаллической структуры (рис. 4а). После отсоединения активатора Rho, формин может какое-то время оставаться на остром конце актинового филамента, кепируя его [6,11].

Будучи вытесненным кепирующими белками и/или другими факторами [13], формин снова может вернуться в цитоплазму в автоингибированном состоянии, при этом DID-домен взаимодействует с DAD-доменом. Таким образом, активация формина *in vivo*, видимо, требует

совместного действия многих факторов и значительных конформационных изменений, подобно процессам, происходящим при нуклеации и активации сборки актинового филамента другим комплексом WASP-Arp2/3 [14].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-00234).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ю. М. Васильев, Соросов. образов. журн., № 2, 36 (1996).
2. S. H. Lee and R. Dominguez, *Mol. Cells* **29**, 311 (2010).
3. S. Maiti, A. Michelot, C. Gould, et al., *Cytoskeleton (Hoboken)* **69**, 393 (2012).
4. T. Otomo, D. R. Tomchick, C. Otomo, et al., *PLoS One* **5** (9) pii: e12896 (2010).
5. A. G. Nezami, Poy F., and M. J. Eck, *Structure* **14**, 257 (2006).
6. J. B. Moseley, I. Sagot, A. L. Manning, et al., *Mol. Biol. Cell* **15**, 896 (2004).
7. M. Lammers, R. Rose, A. Scrima, and A. Wittinghofer, *EMBO J.* **24**, 4176 (2005).
8. F. Li and H. N. Higgs, *J. Biol. Chem.* **280**, 6986 (2005).
9. T. Otomo, D. R. Tomchick, C. Otomo, et al., *Nature* **433**, 488 (2005).
10. R. Rose, M. Weyand, M. Lammers, et al., *Nature* **435**, 513 (2005).
11. D. Pruyne, M. Evangelista, C. Yang, et al., *Science* **297**, 612 (2002).
12. A. Seth, C. Otomo, and M. K. Rosen, *J. Cell Biol.* **174**, 701 (2006).
13. M. Chesarone, C. J. Gould, J. B. Moseley, and B. L. Goode, *Dev. Cell* **16**, 292 (2009).
14. S. B. Padrick and M. K. Rosen, *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 707 (2010).