

Министерство образования и науки РФ
федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Московский физико-технический институт (национальный
исследовательский университет)»
Факультет общей и прикладной физики
Образовательная программа "Вычислительная физика конденсированного состояния
и живых систем"

**Влияние конформации остатка пролина на
структурно-динамические характеристики
трансмембранного домена рецептора инсулина**

Диплом на соискание степени бакалавра

Выполнила:

студентка 626 группы
Андреева Дарья Денисовна

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук
Ефремов Роман Гербертович

Москва 2020

Аннотация

Рецептор инсулина (IR) - один из важнейших рецепторов в организме человека: он отвечает за регуляцию гомеостаза глюкозы. Нарушения в его работе приводят к таким болезням, как диабет. Полная пространственная структура IR неизвестна, а наибольшее число вопросов связано с его трансмембранным (ТМ) доменом и ролью ТМ домена в процессе активации рецептора. Поскольку изучение поведения белка в мембране с помощью прямых экспериментов затруднено, перспективным подходом является компьютерное моделирование. В настоящей работе оценили роль конформации пептидной связи Gly-Pro в трансмембранном домене рецептора инсулина с помощью метода молекулярной динамики. В результате предложены возможные структуры трансмембранного димера с цис-конформацией пептидной связи Gly-Pro и выдвинута гипотеза о возможной роли цис-транс изомеризации в работе рецептора.

Содержание

1	Введение	4
2	Обзор литературы	5
2.1	Рецептор инсулина	5
2.2	Трансмембранный домен IR	6
2.2.1	Экспериментальные данные	6
2.2.2	Возможные структуры ТМ димера по данным моделирования	7
2.3	Пролин в трансмембранных α -спиралях	8
2.3.1	Влияние пролина на свойства спирали	8
2.4	Компьютерное моделирование биологических молекул	9
2.4.1	Молекулярная динамика	9
3	Материалы и методы	11
3.1	Структуры ТМ пептидов	11
3.2	Получение траектории МД	12
3.3	Разработанные алгоритмы обработки траектории МД	14
3.3.1	Получение информации о геометрии трансмембранной α -спирали	14
3.3.2	Поиск пересечений двух α -спиралей	14
4	Результаты	16
4.1	Влияние цис-конформации связи Gly-Pro на структурно - динамические параметры мономеров	16
4.1.1	Локальные геометрические параметры трансмембранных спиралей	17
4.2	Предсказание структуры димеров с цис- связью	20
4.3	Обсуждение результатов	23
5	Выводы	25
	Список литературы	26

1 Введение

Компьютерное моделирование - это построение математической модели объектов реального мира с помощью компьютера и вычисление структурных или динамических свойств объектов на основе этой модели. Наиболее перспективен данный подход в отношении тех объектов, которые по какой-либо причине невозможно или сложно исследовать экспериментально.

Методы компьютерного моделирования находят применение как в процессах создания новых материалов, так и в исследовании биологических систем (так называемая "сухая биология"). Численное моделирование, работая в совокупности с экспериментальными методами, способно значительно ускорить и удешевить исследование.

Рецептор инсулина (IR) - один из ключевых мембранных белков в организме человека. Он отвечает за такие важные процессы, как метаболическая регуляция гомеостаза глюкозы, рост и эмбриональное развитие организма. Нарушения в работе IR приводят к трудноизлечимым болезням, таким как диабет. В то же время, не всегда понятны детали работы рецептора. Исследование процесса активации IR на молекулярном уровне - это актуальная задача современной биологии.

На данный момент наименьшее количество экспериментальных данных получено для трансмембранного (ТМ) домена IR. В то же время известно, что он играет важную роль в процессе активации IR. Недостаток экспериментальных данных о ТМ домене IR затрудняет понимание процесса активации рецептора. Исследование структур рецепторов и других мембранных белков оказывается трудоемкой задачей для экспериментальных методов, таких как спектроскопия ядерного магнитного резонанса, рентгеноструктурный анализ и криоэлектронная микроскопия. Поэтому перспективным методом исследования ТМ домена IR является компьютерное моделирование.

В лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН были получены данные, указывающие на то, что ТМ домен IR может существовать в различных конформациях, отличающихся геометрией примембранного N-концового участка. Есть основания полагать, что эти изменения связаны с изменением конформации пептидной связи Gly957-Pro958. Целью настоящей работы является исследование структурно-динамических свойств ТМ домена IR с разной конформацией упомянутой пептидной связи.

2 Обзор литературы

2.1 Рецептор инсулина

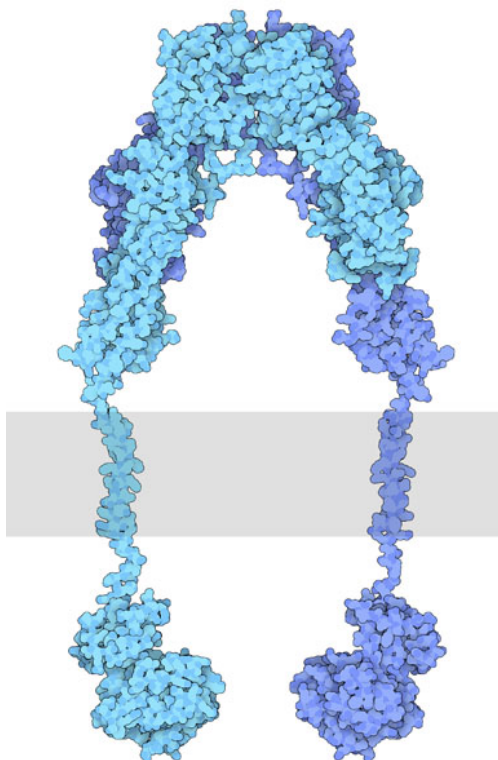


Рис. 1: Схематичное изображение модели пространственной структуры димера рецептора IR в неактивном состоянии в мембране. Синим и голубым цветами показаны два мономера рецептора. Сверху расположен внеклеточный домен; внутриклеточный (киназный) домен изображен снизу; мембрана схематично показана серым цветом, её пронизывает α -спиральный ТМ домен. [2]

Рецептор инсулина (IR) - мембранный белок, активируемый инсулином и инсулиноподобными факторами роста I и II (IGF-I и IGF-II). Он принадлежит обширному классу рецепторных тирозинкиназ и представляет собой интегральный белок (прочно связанный с цитоплазматической мембраной). Он работает в форме димера (т.е. состоит из двух одинаковых молекул, пронизывающих мембрану), при этом предполагается активное взаимодействие всех частей молекулы в процессе активации.

В рецепторе инсулина выделяют внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный (киназный) домены (рис. 1). Внеклеточный домен связывается с лигандом, трансмембранный домен передает сигнал от внеклеточного домена к киназному, а последний осуществляет реакцию фосфорилирования остатков тирозина в сигнальном белке, что приводит к каскаду химических реакций и, соответственно, клеточному ответу.

В организме человека рецептор инсулина существует в двух изоформах: IR-A и IR-

В. Они различаются по аффинности к IGF-I и IGF-II. Установлено, что IR-A отвечает за внутриутробный рост и развитие, а IR-B отвечает за метаболическую регуляцию [3].

Поскольку рецептор отвечает за столь важные процессы в организме человека, нарушения в его работе приводят к различным клиническим проявлениям, в том числе к инсулинонезависимому диабету. Нарушения возможны на всех этапах работы рецептора, поэтому важно рассматривать весь процесс активации на молекулярном уровне, в том числе и поведение ТМ доменов в мембране.

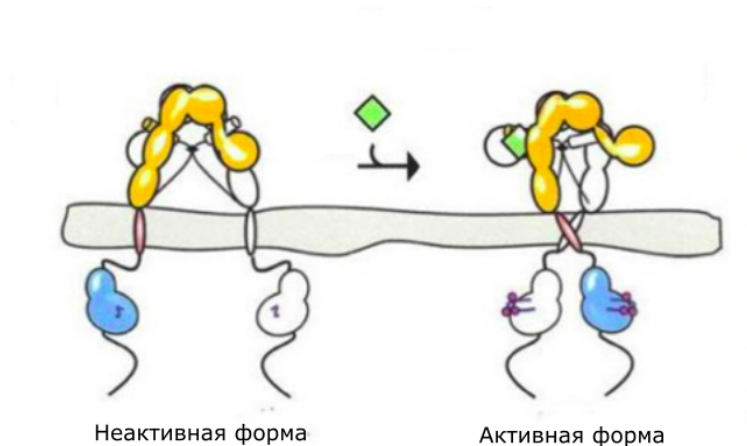


Рис. 2: Модель активации рецептора инсулина, основанная на димеризации ТМ домена. [5]. Желтым изображен внеклеточный домен одного из мономеров, синим отмечен киназный домен этого мономера, розовым покрашен ТМ домен этого мономера. Серым окрашена мембрана. Второй мономер изображен белым цветом.

Существуют различные модели активации IR, отличающиеся разным взглядом на поведение ТМ доменов в разных состояниях рецептора. На данный момент общепринятой моделью, подтверждающейся экспериментальными данными, является предложенная Lee и соавторами [6] (см рис. 2). В данной модели после активации инсулином две части внеклеточного домена сближаются, тем самым сближая α -спирали ТМ домена. ТМ домен димеризуется и далее киназный домен переходит в активное состояние.

2.2 Трансмембранный домен IR

2.2.1 Экспериментальные данные

Ранее с помощью метода двумерной ЯМР-спектроскопии была расшифрована структура мономера ТМ домена IR в мицеллах [7]. Несмотря на то, что в работе удалось получить только мономеры белка, авторы указывают на возможность существования структур в форме димеров. Одновременно, у мономеров внемембранные участки являются подвижными и располагаются в водном окружении, а трансмембранный участок

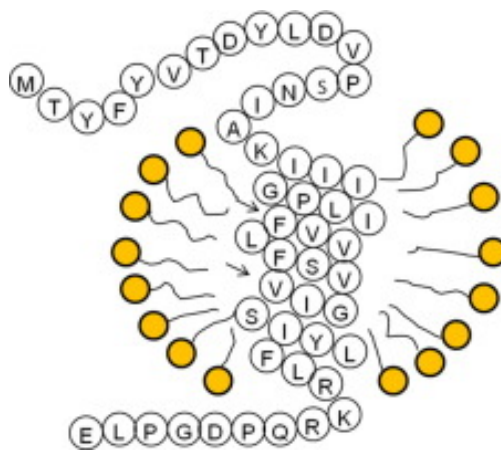


Рис. 3: Схематическое изображение ТМ домена IR в мицелле детергента. Желтым указаны молекулы детергента, буквами обозначены типы аминокислотных остатков в последовательности белка, для наглядности водное окружение не показано. [7].

имеет структуру α -спирали. При этом в работе был отмечен излом этой спирали, созданный связью Gly957-Pro958, потенциально важный для функции ТМ домена.

В лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН был проведен аналогичный эксперимент с целью получения димерных форм в мицеллах додецилфосфохолина (ДФХ). Был получен фрагмент 944-973 IR и созданы образцы мономерных и димерных форм в мицеллах. Спектры показали неоднозначные результаты в отношении излома Gly-Pro, на основе которых можно предположить наличие двух форм мономера, различающихся конформацией N-концевого фрагмента (для димера - три различные формы) [9].

2.2.2 Возможные структуры ТМ димера по данным моделирования

Ранее в лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН были предсказаны наиболее вероятные структуры димеров для ТМ доменов IR и других рецепторов этого семейства [8]. Для получения моделей димеров в этой работе был использован программный пакет PREDDIMER [10].

С помощью метода молекулярной динамики оценена стабильность ряда конформаций в явно заданном липидном окружении и выделены 3 наиболее вероятные димерные структуры. Все они имеют характерную водородную связь Ser969-Ser969' (см. рис. 4).

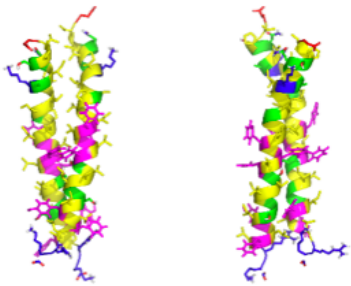
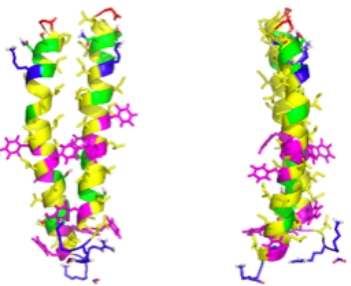
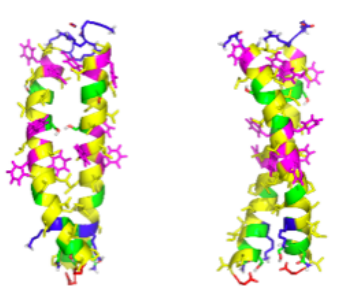
Рецептор инсулина		
Модель 1	Модель 2	Модель 6
		
V _ I _ I _ L _ V _ S _ IG _ YL _ V _ I _ II _ P _ VF _ SV _ G _ L _ R _	V _ I _ I _ L _ VF _ S _ IG _ YLF _ R _ P _ I _ I _ L _ VF _ SV _ G _ YLF _ R _	AK _ I _ L _ F _ S _ YL _ S _ A _ I _ L _ VF _ S _ Y _ R _
Угол скрещивания: -21	Угол скрещивания: -15	Угол скрещивания: 20

Рис. 4: Полученные ранее модели димеров ТМ домена рецептора инсулина до и после расчета МД и их характеристики. Структуры представлены в ленточном представлении. Жёлтым цветом окрашены алифатические аминокислоты, фиолетовым - ароматические, зелёным - полярные незаряженные, красным и синим - отрицательно и положительно заряженные. Ниже указаны интерфейс димеризации (буквами обозначены взаимодействующие аминокислотные остатки, остальные остатки показаны прочерком) и угол скрещивания осей α -спиралей мономеров [8].

2.3 Пролин в трансмембранных α -спиралях

2.3.1 Влияние пролина на свойства спирали

Принято считать, что остаток пролина в трансмембранных α -спиралях играет важную функциональную роль. В пользу этого говорит сравнительно высокая встречаемость пролина в трансмембранных спиралях по сравнению со спиралями водорастворимых белков [11], [12]. Кроме того, известно, что замена Pro в ТМ доменах транспортных белков приводит к их деактивации [13]. Все это дает основание полагать, что пролин может быть функционально важен и в случае IR.

Как компьютерное моделирование, так и экспериментальные данные показывают, что пролин вносит конформационные изменения в геометрию ТМ α -спирали [15], [14]. Цис-конформация пептидной связи между пролином и предшествующим ему остатком создает излом α -спирали, что может изменить ее положение в мембране и, как следствие, модифицировать функциональные свойства пептида.

Также было замечено, что пролин в трансмембранных спиралях имеет достаточно консервативное положение: чаще всего он оказывается в области полярных головок внешнего слоя молекул липидов мембраны [16]. Такое специфическое положение, в свою очередь, имеет связь с процессом димеризации ТМ спиралей. В одной из работ исследовали распределение водородных связей в ТМ сегментах и показали, что пролин в

ТМ доменах может индуцировать димеризацию мономеров в мембране [17]. Этот факт вызывает особый интерес в контексте изучения механизма работы ТМ домена IR.

Еще одним фактом в пользу того, что пролин функционально важен в механизме работы рецептора инсулина является то, что пролин консервативен во всем семействе IR. В него входят рецептор инсулина, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R) и рецептор, подобный рецептору инсулина, (IRR). В ТМ доменах всех трех белков присутствует пролин в гидрофобной части.

2.4 Компьютерное моделирование биологических молекул

2.4.1 Молекулярная динамика

Молекулярная динамика (МД) - один из методов атомистического моделирования. Основой метода является численное решение уравнений движения системы N взаимодействующих атомов:

$$m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = F_i, \quad i = 1..N; \quad F_i = -\frac{\partial V}{\partial r_i} \quad (1)$$

Потенциал $V(r_1, \dots, r_N)$ определяется параметрами силового поля¹.

Полученная система уравнений интегрируется с малым временным шагом Δt на некотором отрезке $[t_0, t_1]$ при заданных начальных условиях $(r_1(t_0), \dots, r_N(t_0))$. В результате, совокупность точек (r_1, \dots, r_N) в каждый момент времени $t_0, t_0 + \Delta t, t_0 + 2\Delta t, \dots, t_1$ составляет траекторию МД. Эта траектория определяет эволюцию системы в течение промежутка времени $[t_0, t_1]$.

При расчёте МД макросистем (10^5 атомов) аналитическое решение уравнений (1) на большом промежутке времени не представляется возможным для современной техники. Поэтому в МД уравнения решаются численно с использованием выбранной разностной схемы.

Критерием корректности расчета МД является стабильность параметров моделируемой. Система должна прийти к равновесному состоянию, в котором флуктуации остаются постоянными на некотором достаточно большом временном отрезке $[t_S, t_2] \gg \Delta t$. В качестве оценочной функции в случае биомолекул используют среднеквадратичное

¹Какое-либо взаимодействие атомов можно описать в рамках соответствующей модели (к примеру, валентную связь между атомами можно описать как идеально жесткую связь или в модели гармонического осциллятора). Модель дает аналитическое выражение для потенциала взаимодействия. Силовое поле - это совокупность потенциалов разных взаимодействий с коэффициентами, подобранными эмпирически, чтобы модель соответствовала объекту в реальной жизни.

отклонение положения атомов белка (или другой макромолекулы) от начального или равновесного положения, усредненное либо по всем атомам молекулы (СКО), либо по временному промежутку (СКФ). Усреднение по атомам позволяет оценить стабильность структуры в целом, а усреднение по времени позволяет отслеживать участки с повышенной подвижностью, которые могут быть функционально важными.

Описанный выше функционал реализуется, в том числе, открытыми программными пакетами, такими как NAMD [20] и Gromacs [19].

3 Материалы и методы

3.1 Структуры ТМ пептидов

Начальная пространственная структура (координаты атомов) мономера ТМ домена IR с транс-конформацией связи Gly957-Pro958 взята из [7]. В настоящей работе варьировали длину рассматриваемого фрагмента и конформацию связи Gly957-Pro958.

Для получения структуры мономера с цис-конформацией пептидной связи Gly-Pro эта пептидная связь была повернута на 180° с помощью программы Rymol. Т.к. в параметризации GROMOS 43a2x ограничены цис-транс переходы пептидных связей, после искусственного изменения угла пептидной связи её конформация сохраняется в течение всей траектории МД.

Таблица 1: Описание структур пептидов

Обозначение	Gly-Pro	Аминокислотная последовательность
ТРАНС-Д	ТРАНС	VTDYLDVPSNIAKIIIGPLIFVFLFSVVIGSIYLFRLRKRQPDG
ТРАНС-К	ТРАНС	SNIAKIIIGPLIFVFLFSVVIGSIYLFRLRKR
ЦИС-Д	ЦИС	VTDYLDVPSNIAKIIIGPLIFVFLFSVVIGSIYLFRLRKRQPDG
ЦИС-К	ЦИС	SNIAKIIIGPLIFVFLFSVVIGSIYLFRLRKR

В качестве начальных моделей димеров ТМ доменов IR для исследования влияния цис-конформации связи Gly957-Pro958 на структурно-динамические параметры использовали отреласкированные структуры димеров ТМ домена IR, полученные в [8] и отобранные ранее как наиболее стабильные. В таблице 2 приведены значения угла скрепления осей α -спиралей в этих структурах.

Таблица 2: Выбранные модели димеров ТМ доменов IR и их параметры

Номер структуры	Угол между осями альфа-спиралей мономеров белка, $^\circ$
1	-55
2	-5,3
6	40

Для получения стартовых моделей димеров ТМ доменов IR с цис-конформацией связи Gly-Pro с помощью программного пакета Gromacs провели наложение структуры мономера ЦИС-Д на соответствующую часть димера по атомам основной цепи фрагмента Pe960-Lys978 (наложение проводили отдельно для каждого мономера). Далее

выявляли пересечения двух спиралей димеров между собой методом, описанным в разделе 3.3.2. В результате отбросили геометрически запрещенные структуры, в которых найдены пересечения α -спиралей.

3.2 Получение траектории МД

Ниже приведены основные стадии вычислительного эксперимента.

- Отнесение параметров силового поля для молекул белка, липидов и воды.
- Сборка модельной системы: погружение белка в мембранное окружение.
- Минимизация энергии составленной системы.
- Релаксация системы: приведение системы к заданным значениям температуры и давления.
- Расчет траектории МД.
- Оценка стабильности системы белок + мембрана - расчёты СКО и СКФ для белка.
- Анализ геометрических параметров белка, оценка влияния конформации связи Gly-Pro.

В настоящей работе в качестве мембраны использовали заранее уравновешенный фрагмент липидного бислоя из молекул пальмитоилолеилфосфатидилхолина (ПОФХ). В качестве программного пакета, реализующего алгоритмы МД, а также для оценки стабильности полученной траектории, применяли Gromacs 2019 [19].

Изначально, белок и мембрана представлены в виде отдельных файлов, содержащих информацию о координатах каждого атома и принадлежности к определенной группе. Для объединения белка и липидов в единую систему используется подход InflateGRO [21].

На следующем шаге проводили минимизацию энергии алгоритмом градиентного спуска. После этого с помощью алгоритмов термостата V-rescale и баростата Berendsen осуществляли релаксацию системы для достижения заданных значений температуры (315 K) и давления (1 атм). После этого проводили расчёт траектории МД длиной 200 нс. Для поддержания давления на этом шаге использовали более точный алгоритм Парринелло-Рахмана.

В качестве меры стабильности структуры белка выбрали среднеквадратичное отклонение координат атомов главной цепи от изначального положения (СКО) и среднеквадратичную флуктуацию координат атомов каждого из аминокислотных остатков в ходе МД (СКФ).

Детали вычислительного эксперимента приведены в таблице 3.

Таблица 3: Параметры расчета траектории МД

Программный пакет	Gromacs 2019
Число молекул в системе	1-2 молекулы белка, ≈90 липидов, ≈4500 молекул воды
Молекулы мембраны	ПОФХ
Граничные условия	периодические
Силовое поле	GROMOS 43a2x + параметризация Бергера для липидов + модель воды SPC
Радиус для построения списка ближайших соседей	120 нм
Учет электростатических взаимодействий	Суммирование по Эвальду
Радиус отсечки электростатических взаимодействий	100 нм
Учет взаимодействий Ван-дер-Ваальса	Потенциал Леннарда-Джонса с отсечкой
Радиус отсечки взаимодействий Ван-дер-Ваальса	12 нм
Термостат	V-rescale
Баростат	Berendsen
Минимизация энергии	
методом градиентного спуска	
Максимальное число шагов	100000
Максимальный размер шага	0.01 нм
Релаксация липидного окружения	
Шаг интегрирования по времени	0.002 пс
Число шагов	2 500 000 (всего 5 нс)
Нагрев системы	от 5 К до 315 К за первые 500 пс
Молекулярная динамика	
Шаг интегрирования по времени	0.002 пс
Число шагов	100 000 000 (всего 200 нс)
Температура	315 К

3.3 Разработанные алгоритмы обработки траектории МД

3.3.1 Получение информации о геометрии трансмембранной α -спирали

Одним из подходов к описанию поведения трансмембранного домена белка в мембране является расчёт ряда геометрических параметров: наклона спирали относительно плоскости мембраны, места излома α -спирали и т.д.

Для их расчёта идеальный виток α -спирали, ось которого ориентирована по оси Z, перпендикулярной плоскости мембраны, методом наименьших квадратов накладывали на соответствующий участок трансмембранной спирали. Результатом наложения является матрица поворота витка в пространстве. Процедуру повторяли со сдвигом на 1 аминокислотный остаток вдоль мономера IR.

В настоящей работе алгоритм применяли для определения угла наклона спирали относительно перпендикуляра к плоскости мембраны и для отслеживания изломов спирали. Для определения угла наклона использовали единичный вектор, направленный вдоль оси Z (ось Z перпендикулярна плоскости мембраны). После поворота проекция этого вектора на ось Z определяет косинус угла наклона спирали (см. рис. 5a). Для отслеживания излома спирали, каждый повернутый единичный вектор вычитали из предыдущего. Модуль этой разности показывает наличие излома на данном участке спирали (см. рис. 5b).

Естественным образом, из вышеописанного модуля разности можно также рассчитать угол излома φ :

$$\varphi = \arccos\left(\frac{|\Delta R|}{2} - 1\right).$$

Вычисление геометрических параметров реализовали с помощью скрипта на языке Python с использованием библиотеки MDAnalysis (<https://www.mdanalysis.org>).

3.3.2 Поиск пересечений двух α -спиралей

С помощью последовательного наложения витка α -спирали на всю длину пептида также можно выявить пересечения мономеров в димерах с цис-конформацией связи Gly-Pro, полученных ранее методом наложения. Для этого для всех возможных пар радиус-векторов $\overline{R_1}$, $\overline{R_2}$ высчитывается разность. Если модуль этой разницы меньше некоторого ε , то на этом участке регистрируется пересечение (см. рис. 6).

Величина ε взята равной среднему диаметру α -спирали: 1.5 нм.

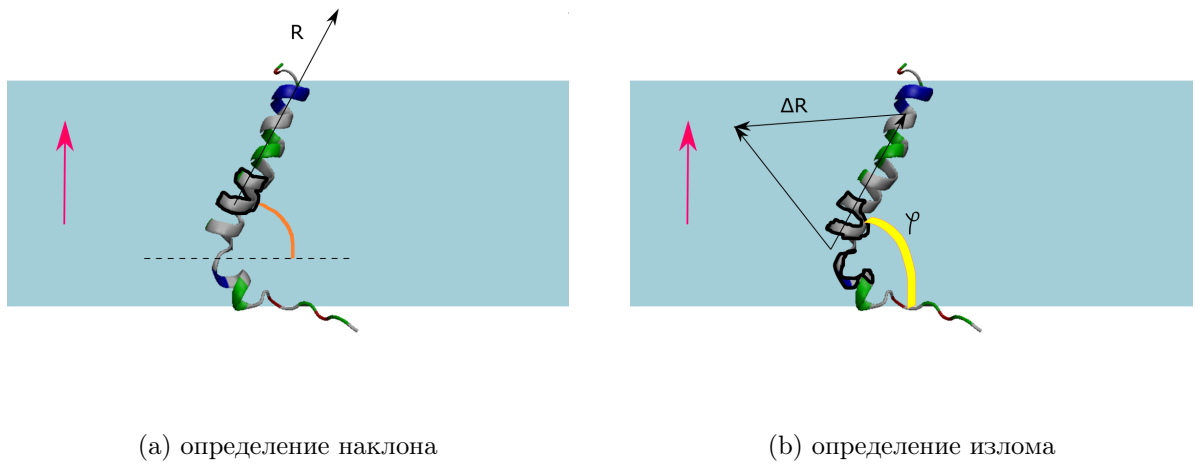


Рис. 5: Схема определения геометрических параметров трансмембранной α -спирали. Голубой областью схематичено обозначена мембрана. Розовой стрелкой показано направление оси Z. Оранжевым отмечен угол наклона α -спирали. Желтым отмечен угол φ излома α -спирали. α -спираль белка представлена в ленточном виде, неполярные остатки показаны белым, отрицательно заряженные - синим, положительно заряженные - красным, полярные - зеленым. Наложенный фрагмент обозначен чёрным контуром.

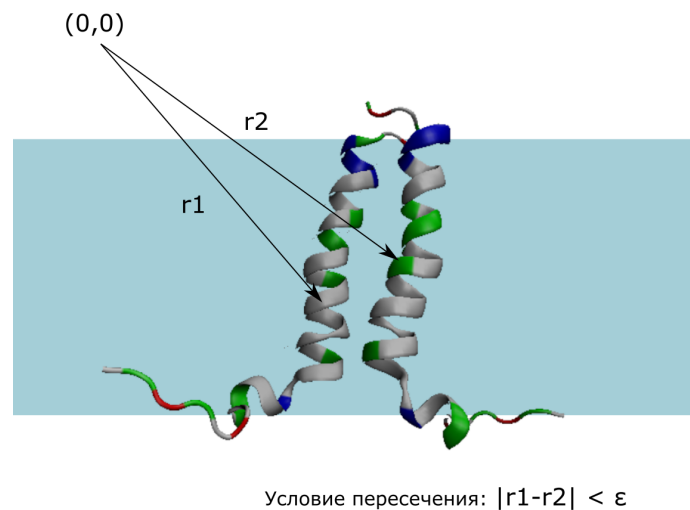
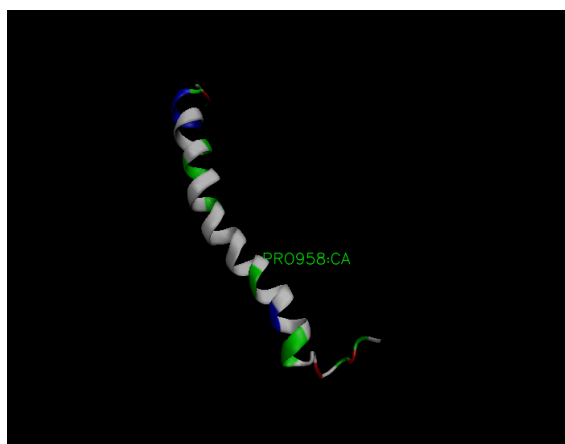


Рис. 6: Схема определения пересечений между мономерами в модельном димере. Наложенный идеальный виток спирали не показан. Цветовые обозначения аналогичны рис. 5.

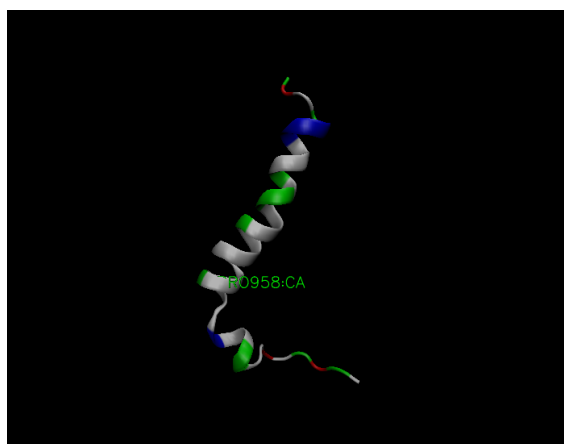
4 Результаты

4.1 Влияние цис-конформации связи Gly-Pro на структурно - динамические параметры мономеров

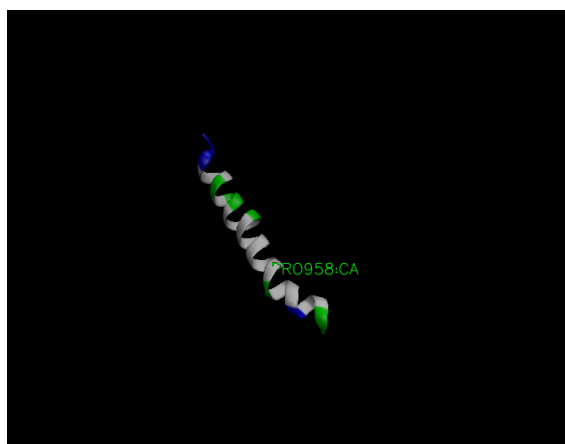
В работе были получены структуры мономеров с цис- и транс-конформацией пептидной связи Gly957-Pro958. Отметим, что длина внешних свободных участков сильно влияет на структуру пептида: в случае короткого примембранного участка с N-конца часть спирали с цис-конформацией Gly-Pro (ЦИС-К) разворачивалась. Описание пептидов приведено в таблице 1. Полученные в ходе МД структуры показаны на рис. 7.



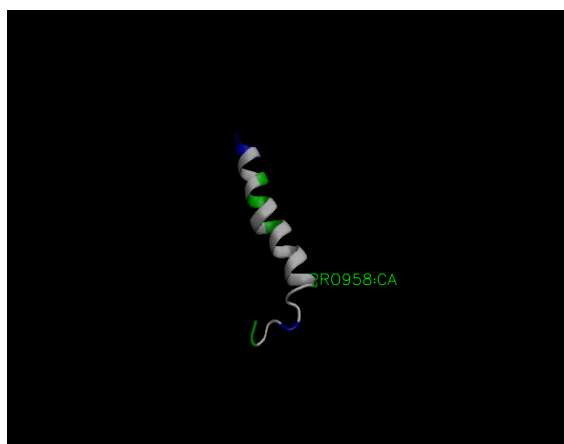
(a) ТРАНС-Д



(b) ЦИС-Д



(c) ТРАНС-К



(d) ЦИС-К

Рис. 7: Стабильные структуры мономеров ТМ доменов IR: ТРАНС-Д, ЦИС-Д, ТРАНС-К, ЦИС-К. Молекулы липидов и воды не показаны для наглядности. Цветовые обозначения аминокислот аналогичны рис. 5.

На рис. 8 представлены графики СКО и СКФ для всех четырех пептидов. По графикам СКО можно видеть, что исследованные пептиды стабильны в мембранном окружении, т.к. устанавливается стабильное значение СКО. При этом значения СКО для ЦИС-Д и ТРАНС-Д выше, чем таковые для коротких пептидов, что соответствует изменению

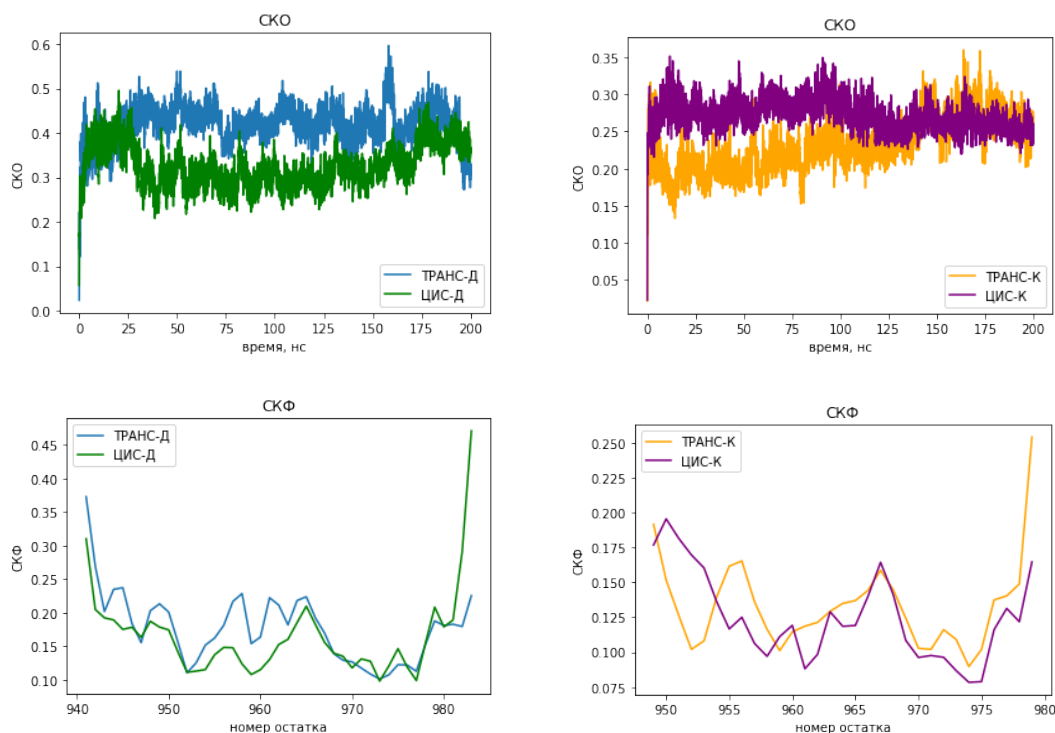


Рис. 8: Графики СКО и СКФ четырех пептидов: синий - ТРАНС-Д, зеленый - ЦИС-Д, желтый - ТРАНС-К, фиолетовый - ЦИС-К.

конформации длинных примембранных участков. По графикам СКФ можно сравнить подвижность соответствующих остатков основной цепи в случае цис и транс конформации. Интересно заметить, что в случае ТРАНС-К наблюдается высокая подвижность в области остатков Gly957-Pro958. Вероятно, данная область является наименее стабильной в выбранном мембранном окружении. В длинном транс пептиде (ТРАНС-Д), из-за дополнительного уравнивания длинным внешним участком, такого эффекта не наблюдали.

Также стоит отметить, что у обоих пептидов с цис-связью пролин располагается в области полярных головок фосфолипидов мембраны (см. рис. 7).

4.1.1 Локальные геометрические параметры трансмембранных спиралей

Можно видеть, что пептид ТРАНС-Д является прямым и расположен вертикально в мембране. Пептиды ЦИС-Д и ТРАНС-К имеют наклон относительно оси Z (ЦИС-Д $\approx 45^\circ$, ТРАНС-К $\approx 65^\circ$.) Также, по красному графику СКО наложения витка можно видеть, что в области Pro958 пептида ЦИС-Д формируется излом - виток с идеальной спиральной конформацией накладывается на этот участок с высокой погрешностью. У пептида ЦИС-К с N-конца и до остатка Pro958, вероятно, находится развернутый участок.

По графикам угла излома можно видеть, что у пептида ЦИС-Д самый большой из-

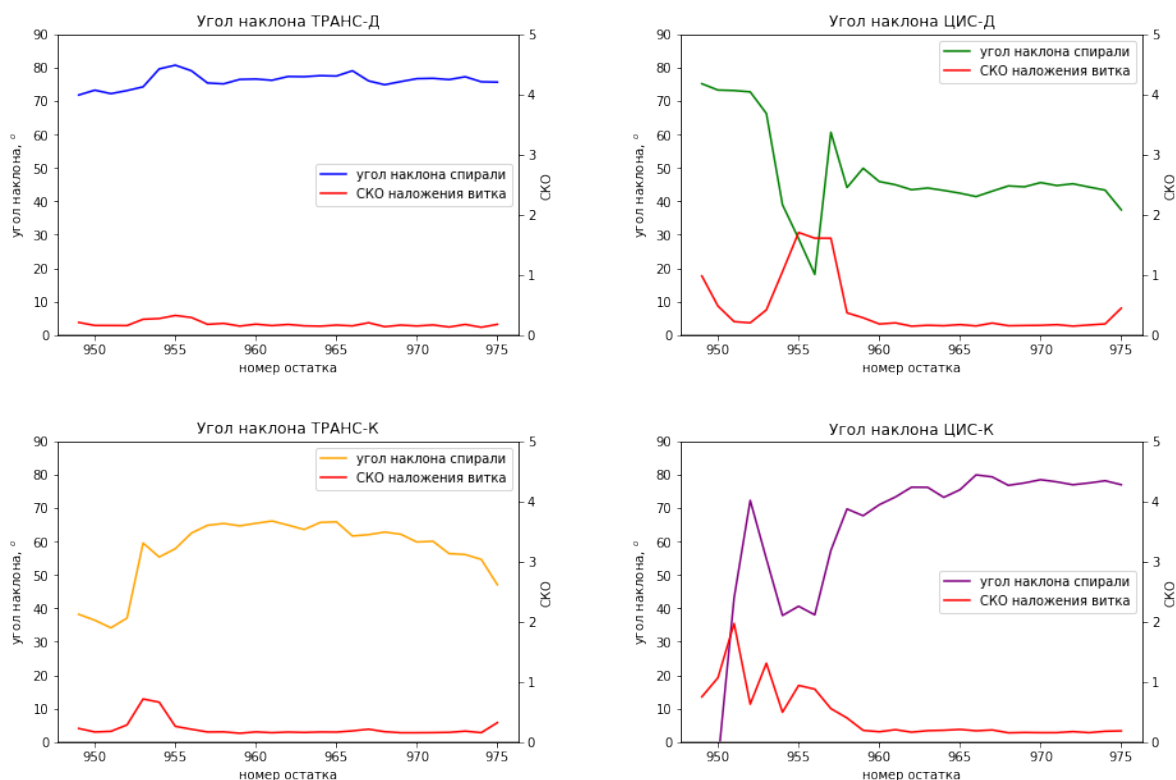


Рис. 9: Графики угла наклона α -спирали в зависимости от остатка (90° соответствует вертикальной ориентации оси спирали). Красным показано значение СКО, характеризующее наложение идеального витка на текущий фрагмент. Остальные обозначения как на рис. 8

лом присутствует в области остатков Gly957-Pro958. Аналогичный излом можно видеть и у ЦИС-К на развернутом участке.

Далее была дополнительно получена зависимость угла излома φ α -спирали пептидов в области связи Gly957-Pro958 от времени симуляции (рис. 11). Можно видеть, что у пептидов ТРАНС-Д и ТРАНС-К значение угла составляет 180° градусов, что соответствует непрерывной спиральной структуре, а у ЦИС-Д и ЦИС-К есть излом (угол $130 - 140^\circ$), и он сохраняется неизменным на протяжении всего времени симуляции. Из этого можно сделать вывод, что структура цис-пептидов является жесткой в области Gly957-Pro958, что является важным фактом для дальнейшего поиска структур димеров, допускающих цис-конформацию данной связи.

Из полученных данных можно сделать вывод, что цис-конформация пептидной связи Gly957-Pro958 создает излом в трансмембранной α -спирали пептида ТМ домена IR. При этом, наличие или отсутствие примембранных участков также влияет на структуру пептида, что согласуется с предположением о том, что конформационные изменения в ТМ домене IR индуцируются через внешние участки, соединяющие ТМ домен с вне-

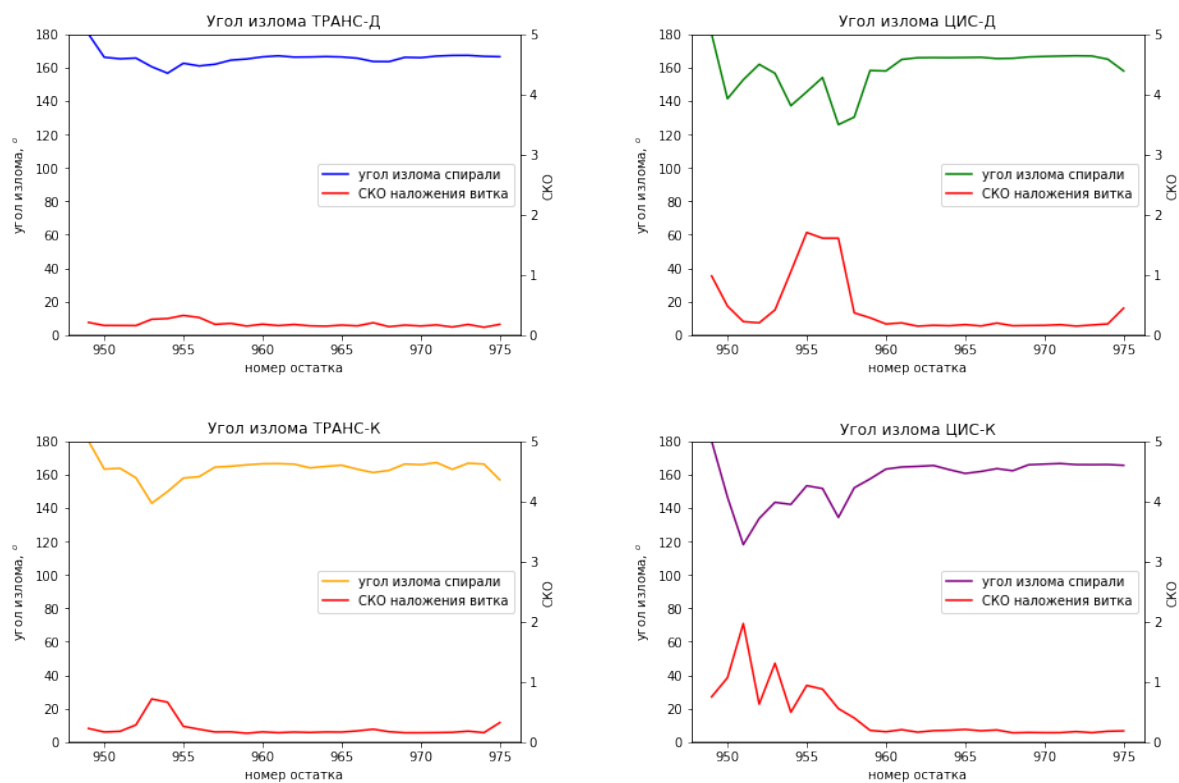


Рис. 10: Графики излома α -спирали в зависимости от остатка (180° соответствует прямой спирали без изломов.) Остальные обозначения как на рис. 9

клеточным и киназным доменами.

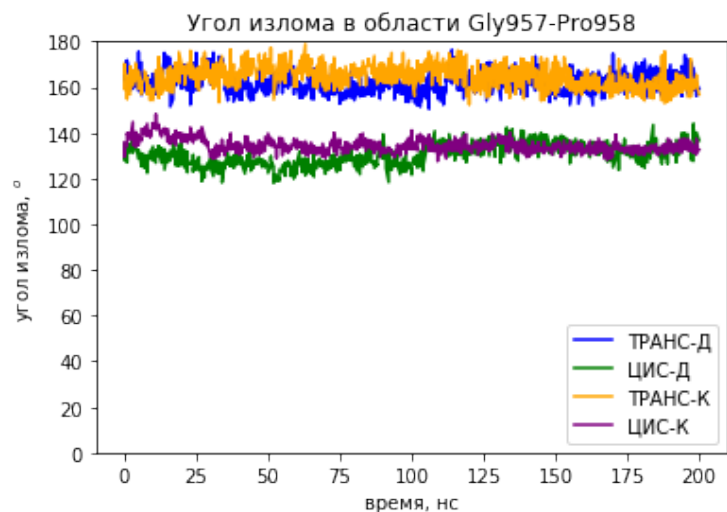
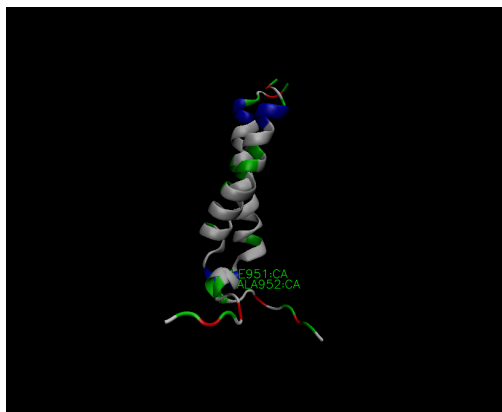


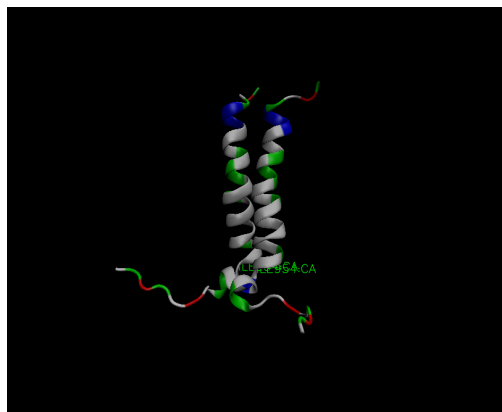
Рис. 11: График угла излома α -спирали в зависимости от времени в траектории МД. Цветовые обозначения как на рис. 9

4.2 Предсказание структуры димеров с цис- связью

Поскольку цис-конформация связи Gly-Pro предполагает жёсткую изогнутую структуру мономеров, её возникновение в димерах может быть стерически ограничено, то есть при построении таких моделей мономеры будут пересекаться (рис. 12)



(a) Цис-цис димер 1



(b) Цис-цис димер 6



(c) Цис-цис димер 2

Рис. 12: Изображения димеров после наложения ЦИС-Д на оба мономера. У цис-цис димеров, полученных из моделей 1 и 6 есть пересечения (в остатках 954-954 и 952-951 соответственно). У цис-цис димера, полученного из модели 2 нет пересечений. Молекулы липидов и воды не показаны для наглядности. Обозначения аминокислот аналогичны рис. 5.

Мы анализировали возможность образования гомо- и гетеродимеров для трёх возможных вариантов упаковки в димер [8]. Результаты работы алгоритма представлены в таблице 4. В таблице показаны найденные пересечения по номерам остатков.

В силу предположения о том, что димеризация происходит для цис-мономеров (см. 2.3.1), далее рассматривали только цис-цис димеры. Как видно из таблицы 4, это цис-цис димер, полученный из структуры с номером 2.

Таблица 4: Пересечения мономеров в димерах с ЦИС конформацией

Номер димера	Пересечения (номера остатков)		
	ЦИС-ТРАНС	ЦИС-ЦИС	ТРАНС-ЦИС
1	-	954-954	-
2	-	-	-
6	959-959	952-951	-

Таким образом, была получена единственная структура цис-цис димера, возможная из геометрических соображений. Она является стабильной в мембране (см. рис. 13) и представляет собой симметричный димер со скрещенной упаковкой мономеров (см. 12a).

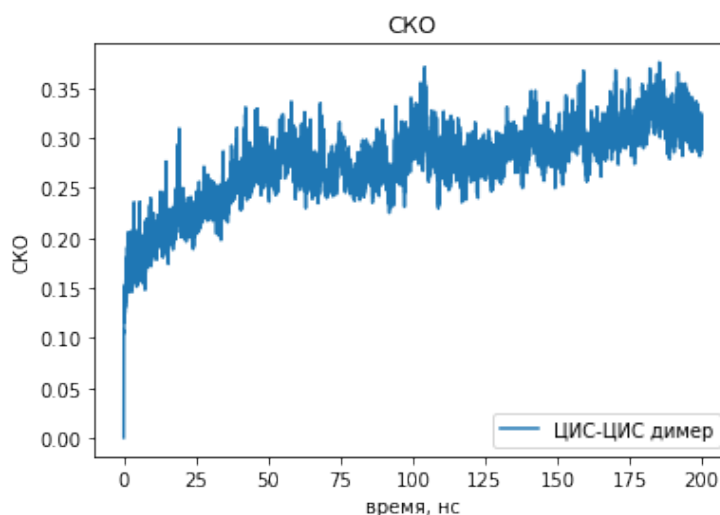


Рис. 13: График зависимости СКО для димера с цис конформацией обоих мономеров от времени.

Далее представлен график СКФ (рис. 14). Для сравнения рядом приведен аналогичный график для транс-транс димера, на базе которого был получен данный цис-цис димер. По графику СКФ можно сделать вывод, что ЦИС-ЦИС димер более стабилен, чем аналогичный ТРАНС-ТРАНС димер с таким же интерфейсом димеризации.

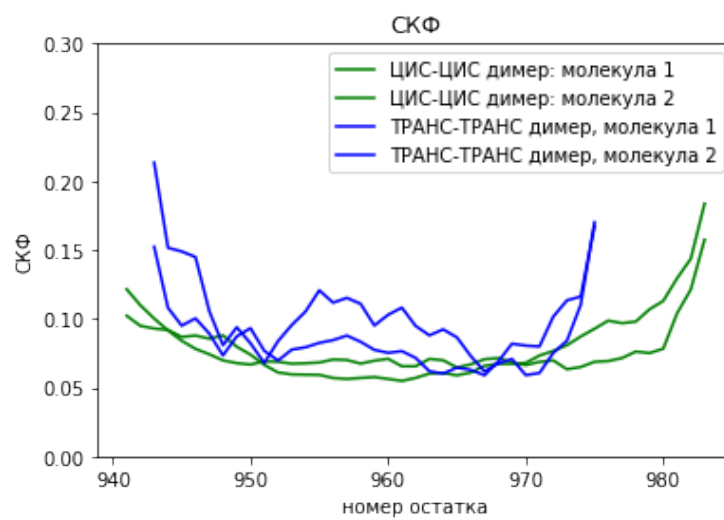


Рис. 14: Графики СКФ димеров с цис-цис и транс-транс конформациями мономеров (модель 2).

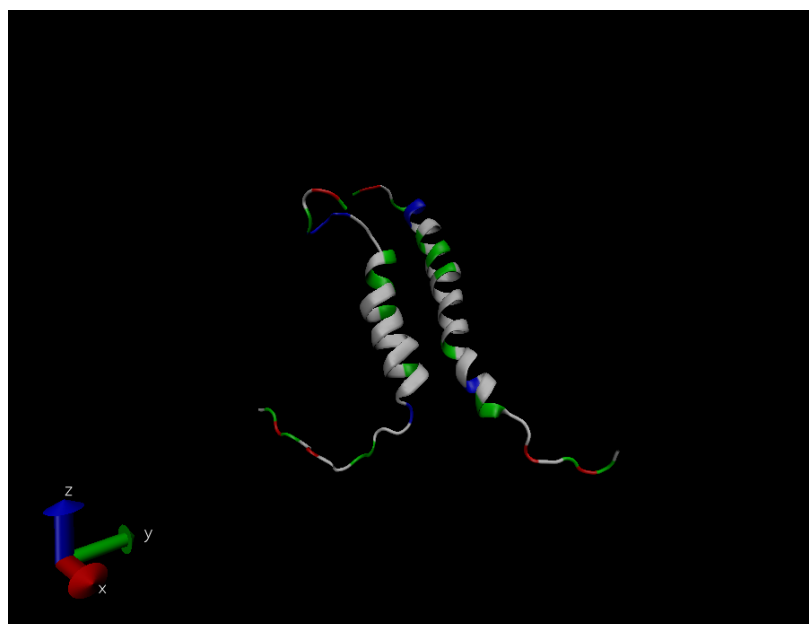


Рис. 15: Стабильный димер с цис-конформацией обоих мономеров.

5 Обсуждение результатов

При внесении цис-конформации пептидной связи Gly957-Pro958 наблюдали следующие эффекты: пролин оказывается на краю мембраны (в области полярных головок липидов), и в области пептидной связи образуется резкий излом. Это находится в соответствии с предшествующими работами [15], [14].

Отдельно из анализа структурно-динамических свойств мономеров с цис- и транс-конформацией следует, что длина примембранного N-концевого участка также влияет на стабильность определенной конфигурации в области Gly957-Pro958. Из этого можно выдвинуть предположение, что примембранные участки, которые соединяют ТМ домен с внеклеточным и внутриклеточным доменами, могут индуцировать цис-транс переход в мономерах ТМ домена.

Учитывая, что димеризации может способствовать наличие пролина в гидрофильной части мембраны [17], выдвинута гипотеза о том, что димеризация ТМ доменов IR происходит, когда момеры принимают цис-конфигурацию. Таким образом, в неактивной форме IR (см. рис. 2) за счет изменений во внеклеточном домене через примембранные участки индуцируется транс-цис переход в мономерах ТМ домена. После этого, вследствие повышенной способности к димеризации (см. [17]), момеры димеризуются и переходят в состояние цис-цис димера (см. рис. 15). Димеризация оказывается предпочтительной в том числе потому, что из-за геометрического излома ТМ участки оказываются приближены друг к другу (см. рис. 16). Далее происходит переход из цис-цис димера в транс-транс димер - активное состояние IR (вероятно, переход происходит за счет приближения внешних участков с N конца).

Описанная выше модель активации основана на предположении о том, что в процессе активации ТМ домен работает симметрично: момеры не образуют цис-транс и транс-цис димеры. Тем не менее, это предположение не имеет строгих обоснований, поэтому модель с цис-транс изомеризацией может быть в дальнейшем дополнена с учетом несимметричных структур.

Также стоит отметить, что практически все полученные структуры для мономеров и димеров ТМ домена IR оказались в той или иной степени наклоненными в мембране. Это может говорить о том, что толщина модельной мембраны из ПОФХ, в которой производились расчёты является недостаточной для ТМ домена IR. Этот и другие рецепторы семейства IR обычно расположены в липидных рафтах - утолщенных участках мембраны с высоким содержанием гликолипидов и холестерина [22]. Из этого следует, что реальные свойства ТМ домена в жизни могут несколько отличаться от полученных нами в модельной системе, и учёт специфических свойств мембраны может оказать влияние на результаты, полученные в настоящей работе.

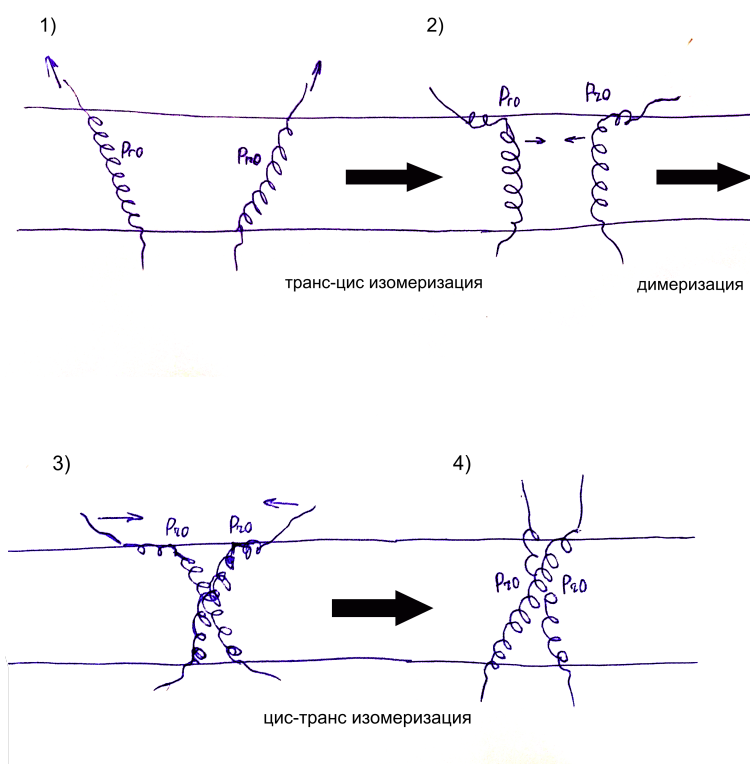


Рис. 16: Возможная схема активации IR с цис-транс изомеризацией связи Gly-Pro в ТМ домене. 1. Внеклеточным доменом (не показан) индуцируется транс-цис-переход в мономерах. 2. Цис-мономеры димеризуются в цис-цис димер. 3. Внеклеточным доменом индуцируется цис-транс переход - димер переходит в транс-транс конфигурацию. 4. ТМ домен в активной форме транс-транс димера.

6 Выводы

По результатам работы можно сделать следующие выводы:

- Мономеры ТМ домена IR с цис-конформацией пептидной связи Gly957-Pro958 стабильны в мембранном окружении и, следовательно, могут существовать в природе. Цис-конформация пептида меняет его геометрические свойства: в области пептидной связи образуется излом, и остаток пролина располагается в области полярных головок липидов.
- Подвижность мономеров в области связи Gly957-Pro958 с цис- и транс-конфигурациями пептидной связи зависит от длины примембранного участка: для длинного пептида транс-конформация стабильна, для короткого пептида - нестабильна.
- Пептид с цис-конформацией пептидной связи Gly957-Pro958 является жестким в области этой связи.
- Существует стабильная модель возможного димерного состояния ТМ домена IR, допускающая цис-конфигурацию обоих мономеров. Этот димер имеет симметричную структуру с удаленными друг от друга N концами, лежащими на границе мембраны в области полярных головок фосфолипидов.

Существование димера с цис-цис конфигурацией позволяет предположить возможность механизма активации IR, предполагающего цис-транс полимеризацию связи Gly-Pro ТМ домене. Полученные структуры мономеров и димера могут быть использованы для дальнейшего исследования ТМ домена IR экспериментальными методами.

Список литературы

- [1] Staker B. L., Buchko G. W., Myler P. J. Recent contributions of structure-based drug design to the development of antibacterial compounds //Current opinion in microbiology. – 2015. – Т. 27. – С. 133-138.
- [2] <https://pdb101.rcsb.org/motm/182>
- [3] Belfiore A, Malaguarnera R, Vella V, et al. : Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View. *Endocr Rev.* 2017;38(5):379–431. 10.1210/er.2017-00073
- [4] Uchikawa E, Choi E, Shang G, Yu H, Bai XC. Activation mechanism of the insulin receptor revealed by cryo-EM structure of the fully liganded receptor-ligand complex *Elife.* 2019; 2019 Aug 22.
- [5] De Meyts P. The insulin receptor and its signal transduction network. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, Mclachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth, MA: MDText.com, Inc. (2000).
- [6] Lee J, Miyazaki M, Romeo GR and Shoelson SE. Insulin receptor activation with transmembrane domain ligands. *J Biol Chem* 289: 19769-19777 (2014)
- [7] Q. Li, et al. Solution structure of the transmembrane domain of the insulin receptor in detergent micelles *Biochim. Biophys. Acta*, 1838 (2014), pp. 1313-1321
- [8] Zamaletdinov M.F., Kuznetsov A.S., Maurice P ., Efremov R.G. Putative role of transmembrane domain dimerization in activation of proteins from the Insulin receptor family *J Bioenerg Biomembr.* 2018. V. 50, no. 6, p. 515.
- [9] Бершацкий? Я.В.1,2, Надеждин К.Д.1,2, Бочарова О.В.1,2, Урбан А.С.1,2, Арсеньев А.С.1, Бочаров Э.В.1,2 (ИИБХ РАН, Москва; 2МФТИ, Долгопрудный?) Структурные ЯМР-исследования трансмембранных доменов рецепторов инсулиноподобных факторов роста // XXXII Зимняя молодёжная научная школа ИБХ РАН
- [10] Polyansky A. A. et al. PREDDIMER: a web server for prediction of transmembrane helical dimers // *Bioinformatics.* – 2014. – Т. 30. – №. 6. – С. 889-890.
- [11] Woolfson DN, Mortishire-Smith RJ, Williams DH. Conserved positioning of proline residues in membrane-spanning helices of ion-channel proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175: 733–737
- [12] Alex Peralvarez-Marin, Jose-Luis Bourdelande, Enric Querol, Esteve Padros (2006) The role of proline residues in the dynamics of transmembrane helices: the case of bacteriorhodopsin, *Molecular Membrane Biology*, 23:2, 127-135

- [13] Slepko ER, Chow S, Lemieux MJ, Fliegel L. Proline residues in transmembrane segment IV are critical for activity, expression and targeting of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1. *Biochem J* 2004; 379: 31–38
- [14] Cordes FS, Bright JN, Sansom MSP. Proline-induced distortions of transmembrane helices. *J Mol Biol* 2002; 323: 951–960
- [15] L.K. Iyer, S. Vishveshwara A model for transmembrane helix with a cis-proline in the middle *FEBS Lett.*, 374 (1995), pp. 21-24
- [16] D.N. Woolfson, R.J. Mortishire-Smith, D.H. Williams Conserved positioning of proline residues in membrane-spanning helices of ion-channel proteins *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 175 (1991), pp. 733-737
- [17] N. Sal-Man, D. Gerber, Y. Shai Proline localized to the interaction interface can mediate self-association of transmembrane domains *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1838 (2014), pp. 2313-2318
- [18] Lummis, S., Beene, D., Lee, L. et al. Cis–trans isomerization at a proline opens the pore of a neurotransmitter-gated ion channel. *Nature* 438, 248–252 (2005)
- [19] Abraham M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // *SoftwareX*. – 2015. – T. 1. – C. 19-25.
- [20] Phillips J. C. et al. Scalable molecular dynamics with NAMD // *Journal of computational chemistry*. – 2005. – T. 26. – №. 16. – C. 1781-1802.
- [21] C. Kandt, W.L. Ash, D.P. Tieleman Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins *Methods*, 41 (4) (2007), pp. 475-488
- [22] Delle Bovi R. J. et al. Sterol structure dependence of insulin receptor and insulin-like growth factor 1 receptor activation // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2019. – T. 1861. – №. 4. – C. 819-826.