

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  
Щекотихина 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. Пространственная структура IR до конца не расшифрована, при этом наибольшее число вопросов связано с трансмембранным доменом и его ролью в процессе активации рецептора. Поскольку изучение поведения белка в мембране с помощью прямых экспериментов затруднено, перспективным подходом является компьютерное моделирование. В настоящей работе проводили оценку роли конформации пептидной связи Gly-Pro в трансмембранном домене рецептора инсулина с помощью метода молекулярной динамики. Были получены возможные структуры трансмембранного димера с цис-конформацией пептидной связи Gly-Pro и предложена гипотеза о возможной роли цис-транс изомеризации в работе рецептора.

# Содержание

<b>1</b>	<b>Введение</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Обзор литературы</b>	<b>5</b>
2.1	Рецептор инсулина . . . . .	5
2.2	Трансмембранный домен IR . . . . .	6
2.2.1	Исследование трансмембранного домена . . . . .	6
2.2.2	Экспериментальные данные . . . . .	7
2.2.3	Возможные структуры ТМ димера по данным моделирования . . . . .	7
2.3	Пролин в трансмембранных $\alpha$ -спиралях . . . . .	8
2.3.1	Влияние пролина на свойства спирали . . . . .	8
2.4	Компьютерное моделирование биологических молекул . . . . .	9
2.4.1	Молекулярная динамика . . . . .	9
<b>3</b>	<b>Материалы и методы</b>	<b>11</b>
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 $\alpha$ -спирали . . . . .	14
3.3.2	Поиск пересечений двух $\alpha$ -спиралей . . . . .	14
<b>4</b>	<b>Результаты и обсуждение</b>	<b>16</b>
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 . . . . .	19
4.3	Обсуждение результатов . . . . .	23
<b>5</b>	<b>Выводы</b>	<b>25</b>
	<b>Список литературы</b>	<b>26</b>

# 1 Введение

Компьютерное моделирование - это построение модели объектов реального мира с помощью компьютера. При наличии достаточно точной модели, можно делать предположения о свойствах объекта на основе этой модели. Это позволяет рассчитывать характеристики в том числе тех объектов, которые по какой-либо причине невозможно или сложно исследовать экспериментально.

Методы компьютерного моделирования находят применение как в процессе создания новых материалов, так и в процессе исследования биологических систем (так называемая "сухая биология"). Численное моделирование, работая в совокупности с экспериментальными методами, способно значительно ускорить и удешевить исследование. Структурно-динамические характеристики веществ, полученные численно, ложится в основу эксперимента, снижая затраты на поиск необходимых структур.

Рецептор инсулина (IR) - один из ключевых рецепторов в организме человека. Он отвечает за такие важные процессы, как метаболическая регуляция гомеостаза глюкозы и рост и эмбриональное развитие. Нарушения в работе IR приводят к трудноизлечимым болезням, таким как диабет. Исследование процесса активации IR - это актуальная задача современной биологии.

Исследование структур, расположенных в липидной мембране оказывается трудоемкой задачей для экспериментальных методов, таких как спектроскопия ядерного магнитного резонанса, рентгеноструктурный анализ и криоэлектронная микроскопия. Тем не менее, трансмембранный (ТМ) домен IR играет важную роль в процессе активации IR. Отсутствие достаточного количества данных о ТМ домене IR затрудняет понимание процесса активации рецептора. Поэтому перспективным методом исследования ТМ домена IR является компьютерное моделирование. В настоящей работе проводятся исследования структуры трансмембранного домена IR с помощью методов компьютерного моделирования.

Существуют экспериментальные данные, указывающие на то, что ТМ домен IR может существовать в различных конформациях, отличающихся геометрией пептидов с N конца. Есть основания полагать, что эти геометрические изменения связаны с изменением конформации пептидной связи Gly-Pro. Целью этой работы является исследование структурно-динамических свойств ТМ домена IR в различных конформациях.

## 2 Обзор литературы

### 2.1 Рецептор инсулина

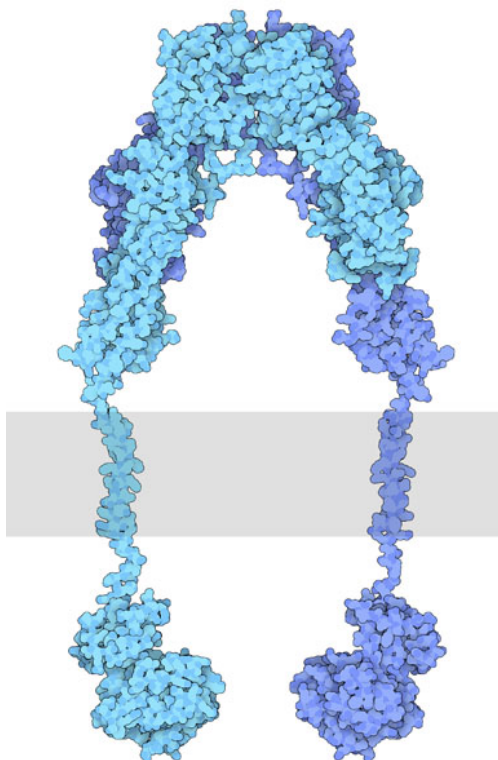


Рис. 1: Схематичное изображение пространственной структуры димера рецептора IR в мембране. Синим цветом показан первый мономер, голубым - второй. Внеклеточный домен изображен сверху; внутриклеточный (киназный домен) изображен снизу; мембрана схематично показана серым цветом. [2]

Инсулиновый рецептор (IR) - это рецептор, активируемый инсулином и инсулиноподобными факторами роста I и II (IGF-I и IGF-II). Он принадлежит обширному классу рецепторных тирозинкиназ и представляет собой интегральный мембранный белок (прочно связанный с цитоплазматической мембраной). Этот белок работает как димер, состоящий из двух одинаковых молекул, пронизывающих мембрану.

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, киназный домен 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-B. Они различаются по аффинности к IGF-I и IGF-II. Так, 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 инсулинонезависимый диабету. Нарушения возможны на всех этапах работы рецептора, поэтому мы рассматриваем процесс активации на молекулярном уровне.

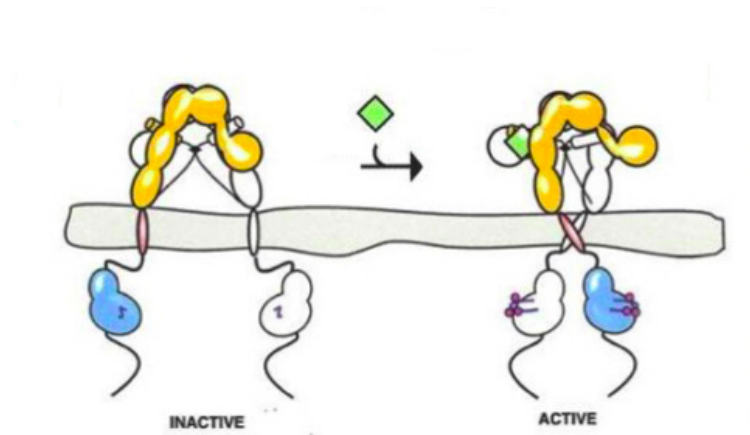


Рис. 2: TODO update picture!!!! Модель активации инсулина, основанная на димеризации ТМ домена. [5]. Желтым изображен внеклеточный домен одного из мономеров, синим отмечен киназный домен этого мономера, оранжевым покрашен ТМ домен этого мономера. Серым показана мембрана. Второй мономер изображен белым светом.

Существуют различные модели активации IR. На данный момент общепринятой моделью, подтверждающейся экспериментальными данными, является предложенная Lee [6] (см рис. 2). В данной модели после активации инсулином две части внеклеточного домена сближаются, тем самым сближая  $\alpha$ -спирали ТМ домена. ТМ домен димеризуется и далее, из-за такого изменения конформации ТМ участка, киназный домен переходит в активированное состояние.

## 2.2 Трансмембранный домен IR

### 2.2.1 Исследование трансмембранного домена

TODO refactor this subsubsection!

В то время как для внеклеточного и киназного доменов возможно подробное исследование структуры экспериментальными методами, в том числе с помощью крио-электронной микроскопии [4], трансмембранный домен представляет особую сложность, т.к. он может существовать только в липидном окружении. Таким образом, в изучении ТМ домена особый интерес представляют методы компьютерного моделирования. Они

позволяют на базе неполных структурных данных проверять теоретические предположения на основе оценки стабильности структур, а так же получать представление о динамике полученных структур в модельном окружении (см. раздел 2.4).

### 2.2.2 Экспериментальные данные

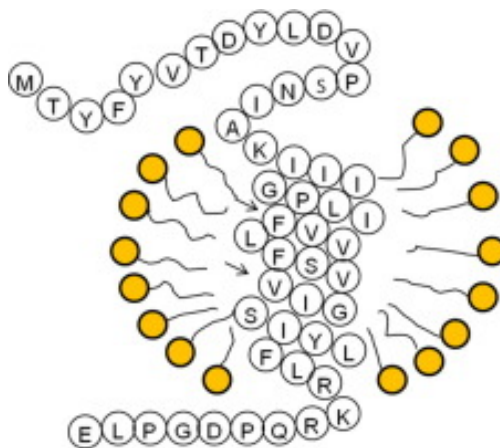


Рис. 3: Схематическое изображение ТМ домена IR в мицелле детергента (желтым указаны молекулы детергента, буквами обозначены типы аминокислотных остатков в последовательности белка, для наглядности водное окружение не показано.) [7].

С помощью метода двумерной ЯМР спектроскопии была расшифрована структура 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 в мицеллах. У мономеров внемембранные участки являются подвижными и располагаются в водном окружении. Трансмембранный участок имеет структуру  $\alpha$ -спирали. При этом был отмечен излом в этой спирали, созданный связью Gly960-Pro961, потенциально важный для функции домена.

В лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН был проведен аналогичный эксперимент с целью получения димерных форм в мицеллахДФХ. Был выделен участок 944-973 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 по форме с N-конца (для димера - три различные формы) [9].

### 2.2.3 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 [8]. Для получения

димеров на основе последовательности мономера был использован программный пакет PREDDIMER [10].

Структуры димеров, полученные с помощью PREDDIMER, затем были помещены в мембранное окружение из молекул пальмитоилолеилфосфатидилхолина (POPC), проведена минимизация энергии, релаксация и расчет траектории молекулярной динамики (3.2). Затем были предложены 3 наиболее стабильные димерные структуры. Все они имеют характерную водородную связь Ser969-Ser969 (см. рис. 4).

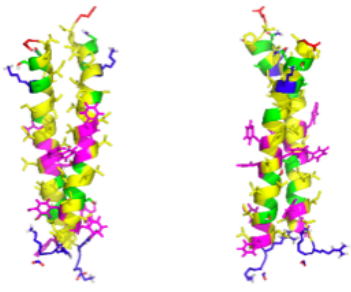
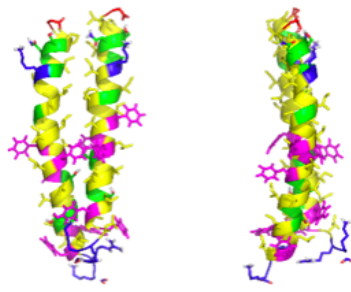
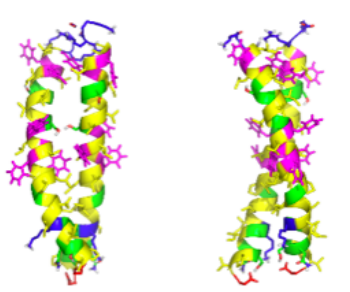
Рецептор инсулина		
Модель 1	Модель 2	Модель 6
		
V    I    I    L    V    S    IG    YL V    I    II   P    VF   SV   G    L    R	V    I    I    L    VF   S    IG    YLF   R P    I    I    L    VF   SV   G    YLF   R	AK    I    L    F    S    YL S    A    I    L    VF   S    Y    R
Угол скрещивания: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

Рис. 4: 3 модели димеров ТМ домена рецептора инсулина до и после расчета МД. Указан интерфейс димеризации (буквами обозначены взаимодействующие остатки, остальные остатки показаны прочерком) и угол скрещивания осей  $\alpha$ -спиралей мономеров [8].

## 2.3 Пролин в трансмембранных $\alpha$ -спиралях

### 2.3.1 Влияние пролина на свойства спирали

Принято считать, что остаток пролина в трансмембранных  $\alpha$ -спиралях играет функциональную роль. На это указывает сравнительно высокая встречаемость пролина в трансмембранных спиралях по сравнению со спиралями водорастворимых белков [11], [12]. Кроме того, было показано, что замена Pro в ТМ домене транспортных белков приводит к их деактивации [13]. Все это дает основание полагать, что пролин может быть функционально важен в трансмембранных доменах большого количества белков.

Как компьютерное моделирование, так и экспериментальные данные показывают, что пролин вносит конформационные изменения в геометрию ТМ  $\alpha$ -спирали [15], [14]. Цис- конформация пептидной связи между пролином и предшествующим ему остатком создает излом в  $\alpha$ -спирали, что может изменять ее положение в мембране и, как



следствие, меняет функциональные свойства пептида.

Также было замечено, что пролин в трансмембранных спиральях имеет достаточно консервативное положение: он чаще всего оказывается "вытащен" в область полярных головок молекул липидов, составляющих мембрану [16]. Такое специфическое положение в свою очередь имеет связь с процессом димеризации ТМ спиралей. Так, путем поиска мотивов, которые образуют водородные связи в процессе димеризации, было обнаружено, что пролин, находящийся в гидрофильной области ТМД (трансмембранного домена) индуцирует димеризацию мономеров в мембране [17]. Этот факт вызывает особый интерес в контексте изучения механизма работы ТМД в 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

Атомистическое моделирование (АМ) - это численный метод исследования вещества. АМ рассматривает вещество как совокупность атомов, взаимодействие между которыми определяет физические свойства вещества.

### 2.4.1 Молекулярная динамика

Молекулярная динамика (МД) - один из методов атомистического моделирования. Он заключается в решении 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 поля<sup>1</sup>.

Полученная система уравнений решается через некоторый малый промежуток времени  $\Delta t$  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  $t_0, t_0 + \Delta t$ ,

---

<sup>1</sup>Какое-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 предмету в реальной жизни.

$t_0 + 2\Delta t, \dots, t_1$  составляет траекторию MD. Эта траектория определяет эволюцию системы в течение промежутка времени  $[t_0, t_1]$ .

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

Критерием расчета MD является стабильность системы предмет + окружение. Систем должна прийти к уравновешенному состоянию, в котором флуктуации остаются постоянными на некотором достаточно большом временном отрезке  $[t_S, t_2] \gg \Delta t$ . В качестве оценочной функции используется среднеквадратичное отклонение положения атомов от изначального или равновесного положения, усредненное либо по атомам (СКО), либо по временному промежутку (СКФ). Усреднение по атомам позволяет оценить стабильность структуры в целом, а усреднение по времени позволяет отслеживать участки повышенной подвижности структуры, которые часто играют большое значение в функции молекулы.

Описанный выше функционал реализуется открытыми программными пакетами, такими как NAMD и Gromacs.

## 3 Материалы и методы

### 3.1 Структуры ТМ пептидов

Изначальная структура мономера ТМ домена IR с транс-конформацией связи Gly957-Pro958 взята из [7]. В настоящей работе варьировали длину рассматриваемого фрагмента и конформацию связи Gly-Gly957-Pro958.

Для получения структуры мономера с цис-конформацией пептидной связи Gly-Pro эта пептидная связь была повернута на  $180^\circ$  с помощью программы Rymol. Т.к. в параметризации GROMOS 43a2x ограничены цис-транс переходы, после искусственного изменения угла пептидной связи этот угол сохранится в процессе расчета 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 основы для исследования влияния цис-конформации связи Gly957-Pro958 на структурно-динамические параметры димеров ТМ домена IR были использованы структуры димеров ТМ домена IR, полученные в [8] и отобранные, как наиболее стабильные. В таблице 2 представлены интерфейс взаимодействия  $\alpha$ -спиралей в димере и их угол скрещивания.

Таблица 2: Димеры ТМ домена IR

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

Для получения структур димеров с цис-конформацией связи Gly-Pro с помощью программного пакета Gromacs провели наложение структуры ЦИС-Д на соответствующую часть димера по атомам основной цепи фрагмента Ile960-Lys978. Далее выявляли пересечения двух спиралей димеров между собой методом, описанным в разделе

3.3.2. В результате определили номера остатков, в которых происходило пересечение  $\alpha$ -спиралей пептидов.

## 3.2 Получение траектории МД

Основные стадии вычислительного эксперимента следующие:

- Соотнесение параметров силового поля для белков и липидов.
- 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 методами RMSD и RMSF.
- Дальнейший анализ полученной траектории (анализ геометрических свойств пептидов в на протяжении симуляции.)

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 [20].

На следующем шаге происходит минимизация энергии алгоритмом градиентного спуска. После этого с помощью алгоритмов термостата V-rescale и баростата Berendsen происходит релаксация системы для достижения заданных значений температуры (315 К) и давления (1 атм). Затем проводили расчёт траектории МД длиной 200 нс без каких-либо ограничений. Для поддержания давления использовали более точный алгоритм Парринелло-Рахмана.

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

В настоящей работе, в качестве мембраны используется заранее уравновешенный фрагмент липидного бислоя из молекул пальмитоилфосфатидилхолина (ПОФХ). В качестве программного пакета, реализующего алгоритмы МД, а также для оценки стабильности полученной траектории, используется Gromacs 2019 [19]. 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
<b>Минимизация энергии</b>	
<b>методом градиентного спуска</b>	
Максимальное число шагов	100000
Максимальный размер шага	0.01 нм
<b>Релаксация липидного окружения</b>	
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
<b>Молекулярная динамика</b>	
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 $\alpha$ -спирали

Одним из подходов к описанию поведения трансмембранного белка в мембране является расчёт ряда геометрических параметров: наклон спирали относительно плоскости мембраны, выявление мест излома или изгиба альфа-спирали и т.д.

Идеальный виток  $\alpha$ -спирали, ось которого ориентирована по оси Z (ось Z перпендикулярна плоскости мембраны), методом наименьших квадратов наложили на соответствующий участок трансмембранной спирали. Результатом наложения является матрица поворота витка в пространстве.

В настоящей работе алгоритм применяется для определения угла наклона спирали относительно перпендикуляра к плоскости мембраны и для отслеживания изломов спирали. Для определения угла наклона используется единичный вектор, направленный вдоль оси Z (ось Z перпендикулярна плоскости мембраны). После поворота согласно полученной матрице проекция этого вектора на ось Z определяет косинус угла наклона спирали (см. рис. 5a). Для отслеживания излома спирали, каждый повернутый единичный вектор вычитается 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  $\varphi$ :

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

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

#### 3.3.2 Поиск пересечений двух $\alpha$ -спиралей

С помощью последовательного наложения витка  $\alpha$ -спирали на всю длину пептида также можно определить возможные пересечения мономеров в димерах, полученных методом наложения. Для этого для всех возможных пар  $\overline{R_1}$ ,  $\overline{R_2}$  высчитывается разность. Если модуль этой разницы меньше некоторого  $\varepsilon$ , то на этом участке регистрируется пересечение (см. рис. 6).

Величина  $\varepsilon$  взята равной среднему диаметру  $\alpha$ -спирали: 1.5 нм.

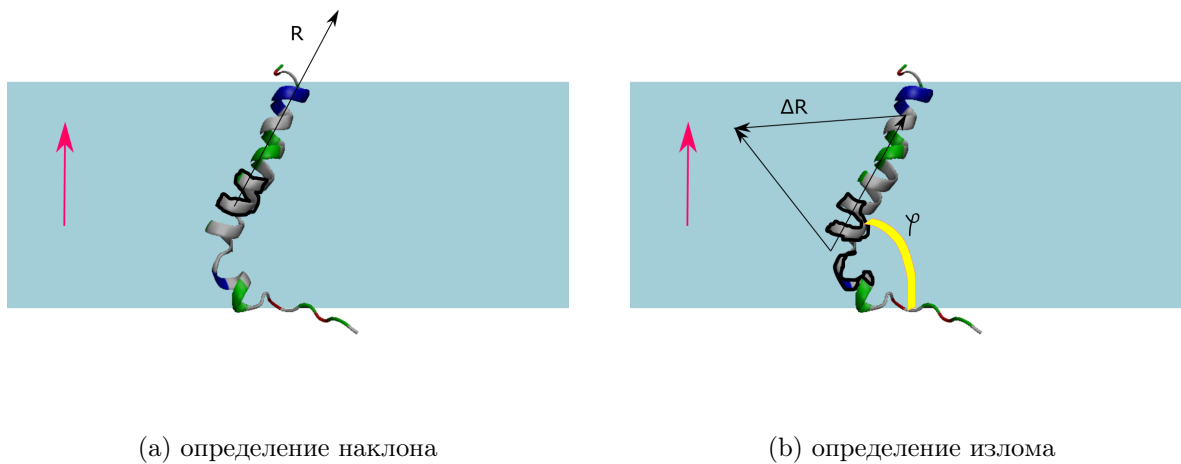


Рис. 5: Схема обработки геометрических данных трансмембранной  $\alpha$ -спирали. Голубым обозначена мембрана. Розовым обозначено направление оси Z. Желтым отмечен угол  $\varphi$ . Здесь и далее белок покрашен в соответствии с цветовым кодом: неполярные остатки - белым, отрицательно заряженные - синим, положительно заряженные - красным, полярные - зеленым.

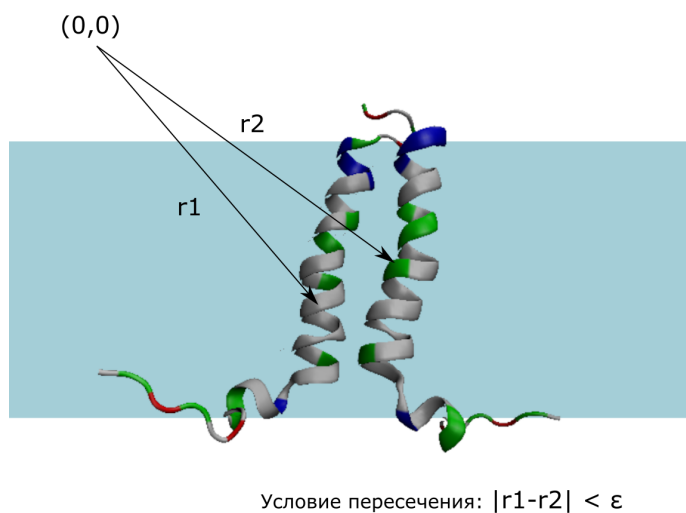
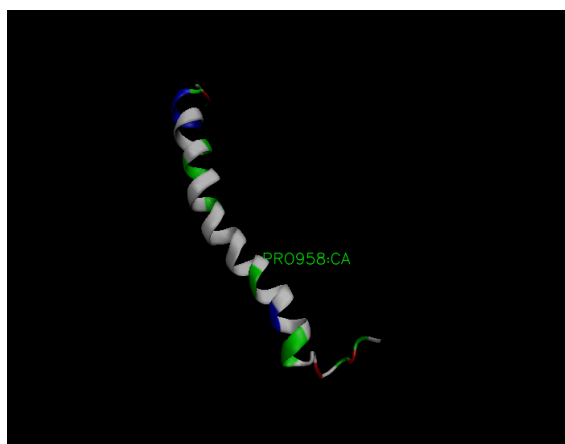


Рис. 6: Схема определения пересечений между мономерами в модельном димере.

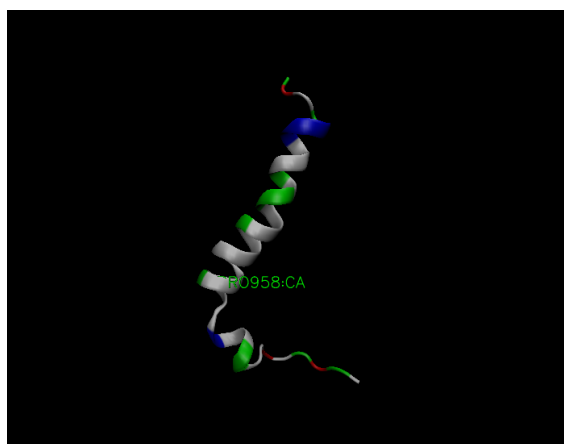
## 4 Результаты и обсуждение

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

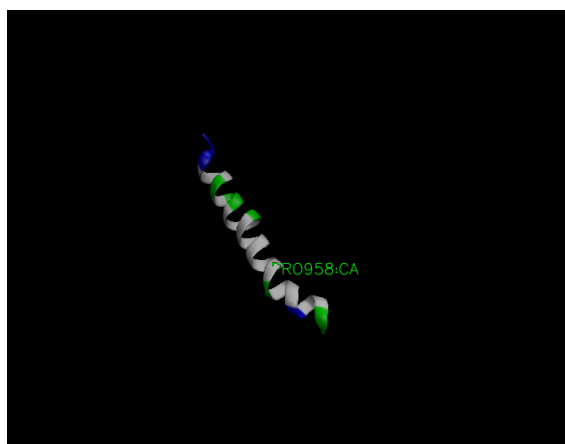
В работе были получены структуры мономеров с цис- и транс-конформацией пептидной связи Gly957-Pro958. Отметим, что длина внешних свободных участков сильно влияет на структуру пептида: в случае короткого примембранного участка с N конца часть спирали с цис-конформацией Gly-Pro разворачивалась. Описание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



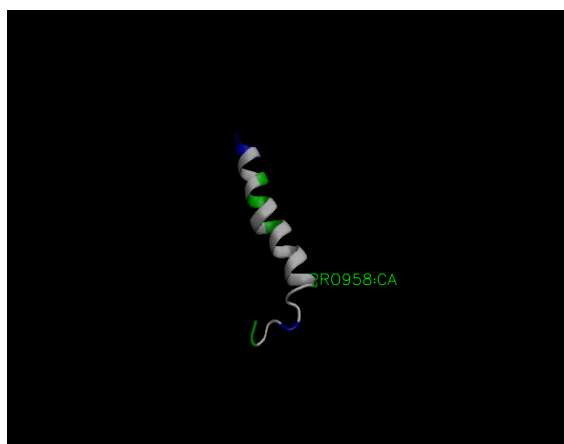
(a) ТРАНС-Д



(b) ЦИС-Д



(c) ТРАНС-К



(d) ЦИС-К

Рис. 7: Стабильные структуры мономеров: ТРАНС-Д, ЦИС-Д, ТРАНС-К, ЦИС-К.

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 конформации длинных примембранных участков. По графикам СКФ можно сравнить подвижность соответствующих остатков основной цепи в случае цис и транс



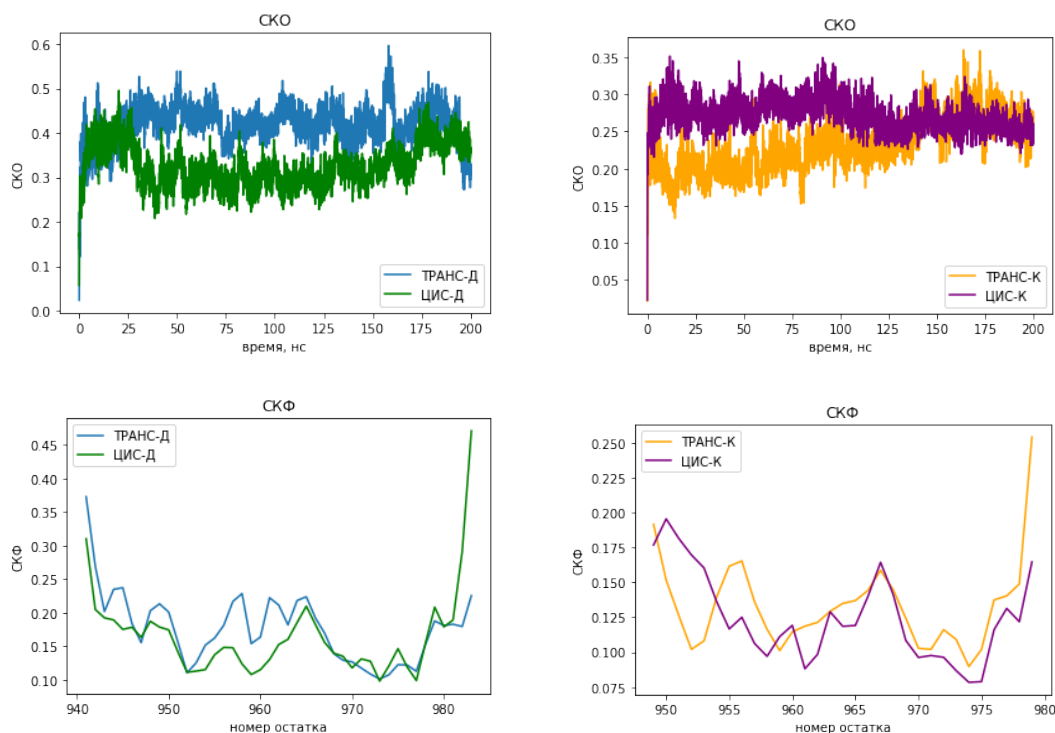


Рис. 8: Графики СКО и СКФ четырех пептидов: синий - ТРАНС-Д, зеленый - ЦИС-Д, желтый - ТРАНС-К, фиолетовый - ЦИС-К.

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, из-за дополнительного уравнивания длинным внешним участком, такого эффекта не наблюдается.

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

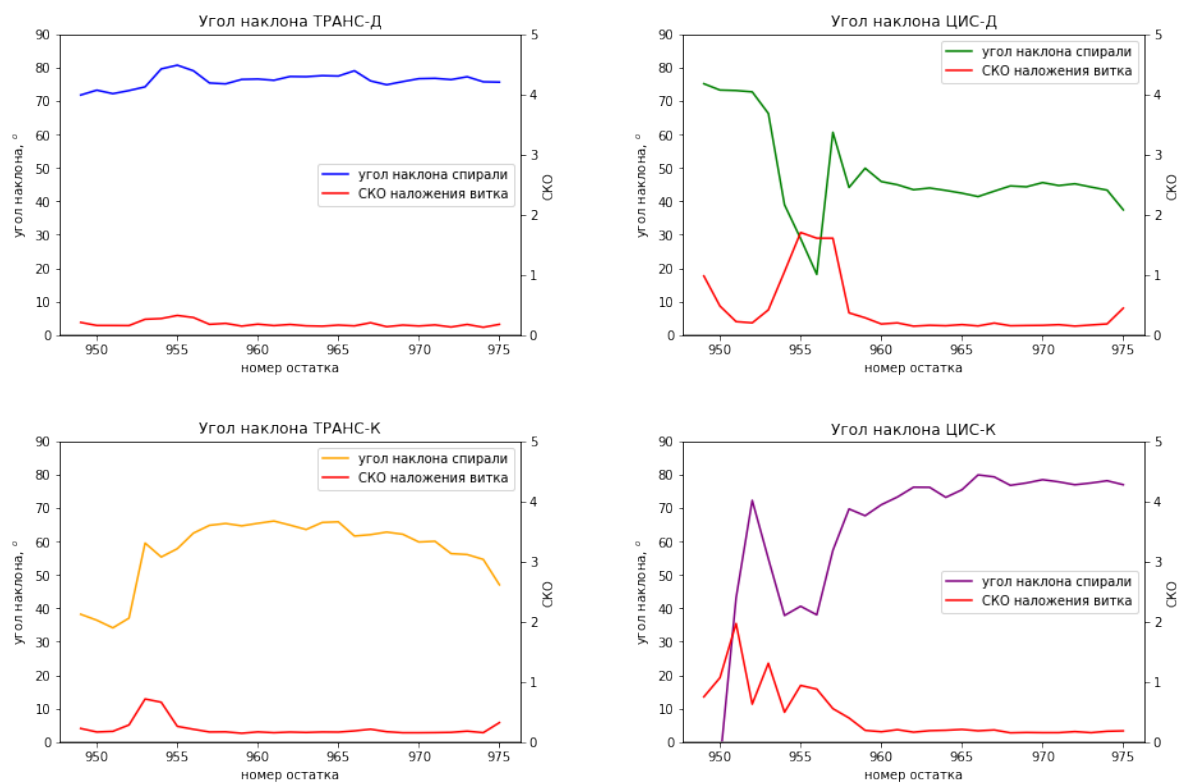


Рис. 9: Графики наклона  $\alpha$ -спирали в зависимости от остатка ( $180^\circ$ - спираль расположена вертикально).

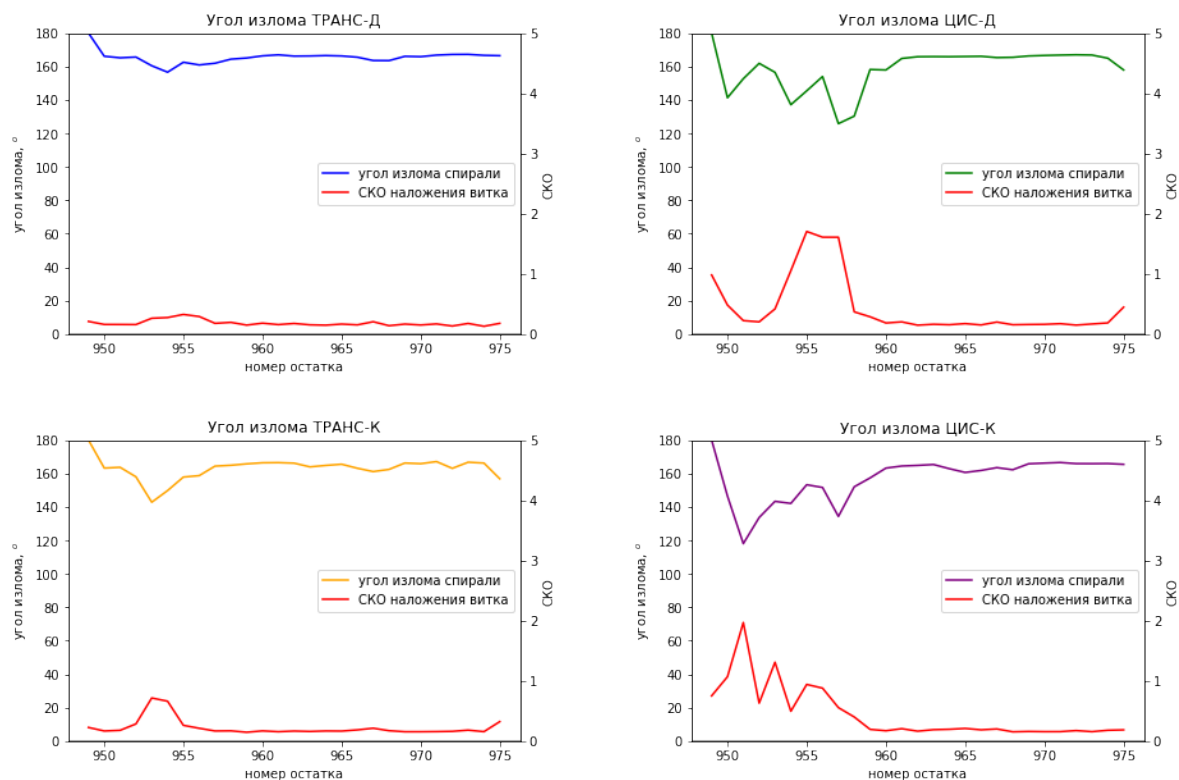


Рис. 10: Графики излома  $\alpha$ -спирали в зависимости от остатка ( $180^\circ$ - прямая спираль.)

Далее была дополнительно получена зависимость угла излома  $\varphi$   $\alpha$ -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  $180^\circ$  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 трансмембраной  $\alpha$ -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 внеклеточным и киназным доменами.

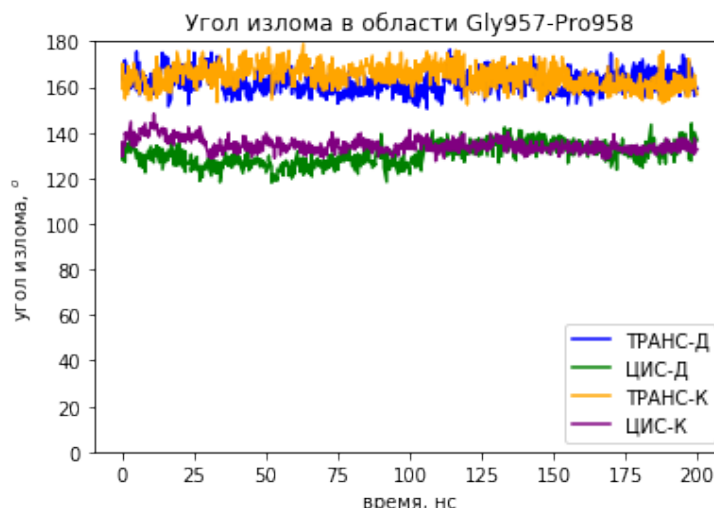
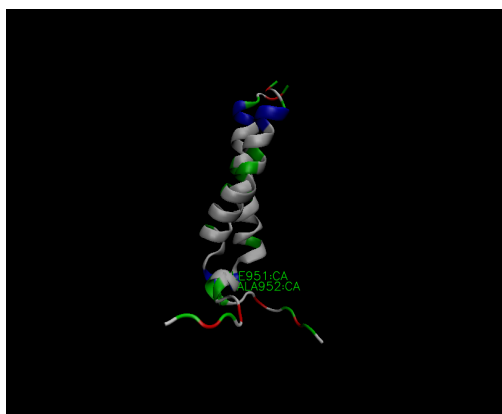


Рис. 11: График угла излома  $\alpha$ -спирали в зависимости от времени в траектории МД.

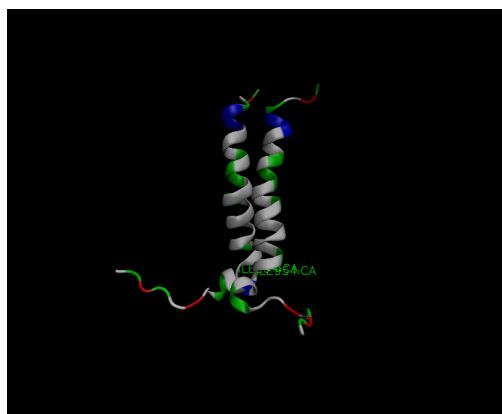
## 4.2 Предсказание структуры димеров с цис- связью

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)

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.



(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.

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

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).

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 профилем димеризации.

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	-

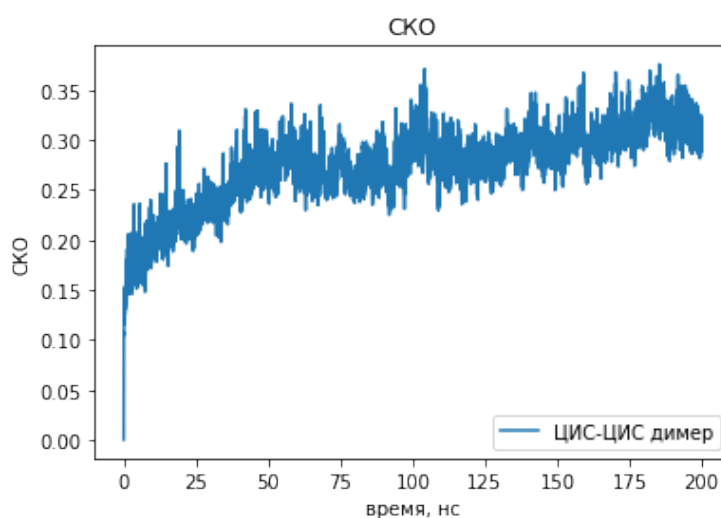


Рис. 13: График СКО для димера с цис конформацией обоих мономеров.

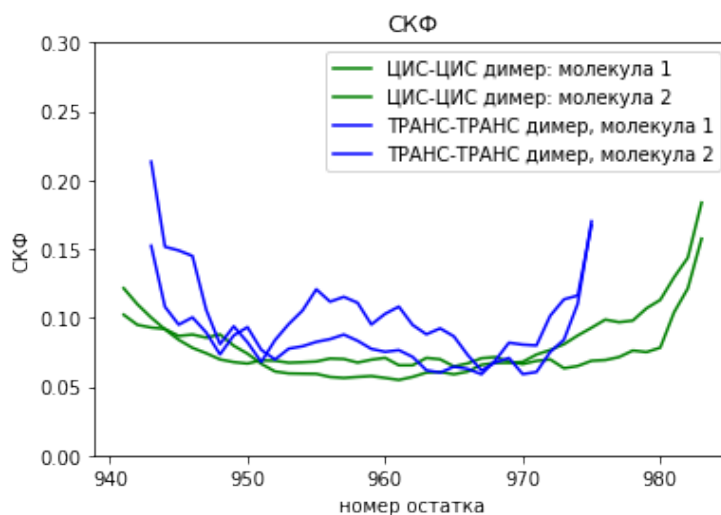
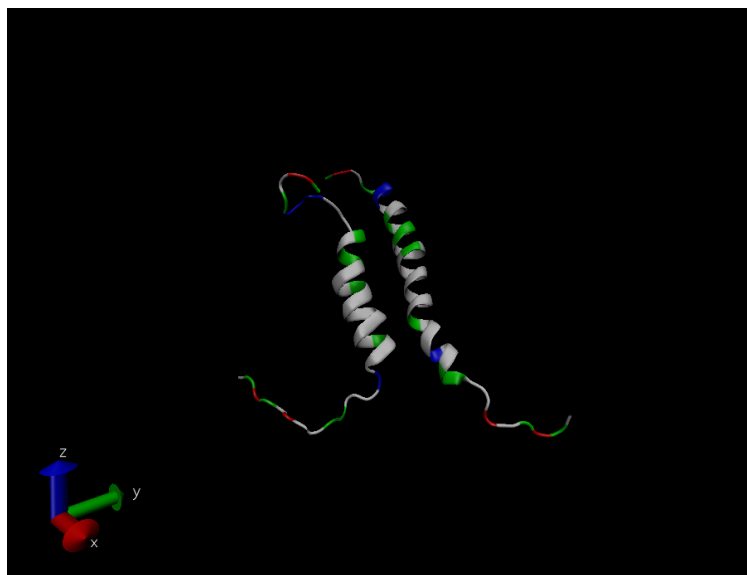
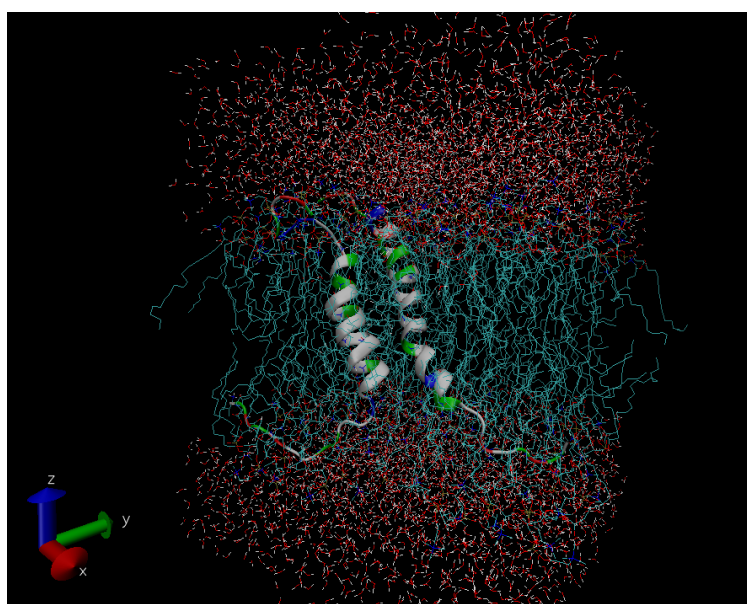


Рис. 14: Графики СКФ димеров с цис-цис и транс-транс конформациями мономеров (димер номер 2).



(a) мембрана скрыта



(b) мембрана показана

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

### 4.3 Обсуждение результатов

При внесении цис-конформации пептидной связи Gly957-Pro958 наблюдаются следующие эффекты: пролин оказывается на краю мембраны 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 можно выделить замечание, что длина цепочки внешних остатков с N и C конца влияет на стабильность определенной конфигурации в области Gly957-Pro958. Из этого можно выдвинуть предположение, что внешние 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], предложена гипотеза о том, что димеризация 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, и поэтому нельзя отрицать возможности ассиметрии в процессе активации IR. 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 мембраны, в которой производились расчеты (ПОФХ) является недостаточной для ТМ домена IR. IR и другие рецепторы семейства IR обычно расположены в липидных рафтах - утолщенных участках мембраны, укрепленных гликофинголипидами и холестерином [21]. Из этого следует, что реальные свойства ТМ домена в жизни могут несколько отличаться от полученных и учет специфических свойств мембраны может уточнить результаты, полученные в настоя-

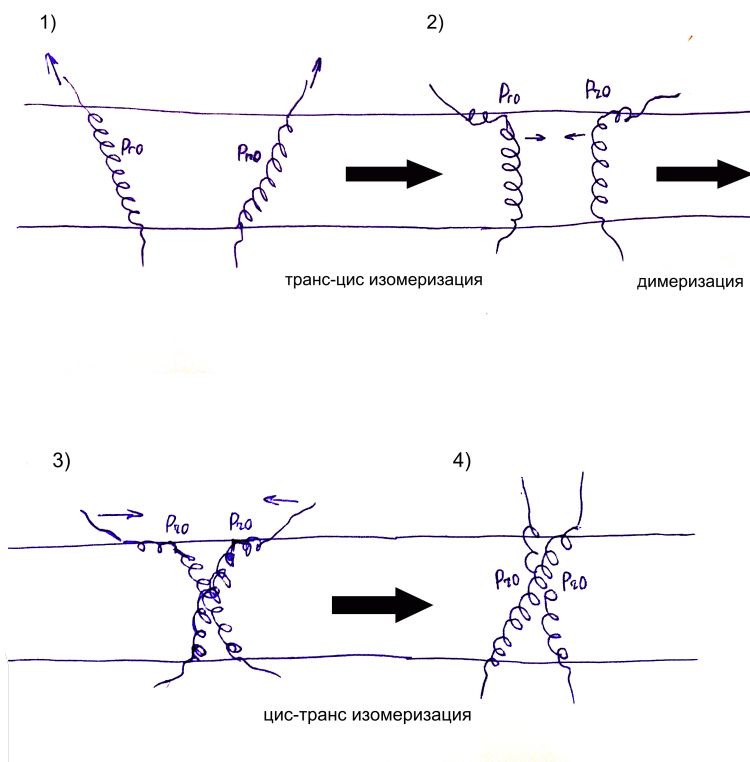


Рис. 16: Схема активации IR с цис-транс изомеризацией связи Gly-Pro в ТМ домене. 1. Внеклеточным доменом (не показан) индуцируется транс-цис-переход. 2. Цис-мономеры димеризуются в цис-цис димер. 3. Внеклеточным доменом индуцируется цис-транс переход - димер переходит в транс-транс конфигурацию. 4. ТМ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

щей работе.



## 5 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 пролин оказывается вытянут к области полярных головок липидов.
- Подвижность мономеров в области связи Gly957-Pro958 с цис и транс конфигурациями пептидной связи зависит от длины внешних участков с N и C конца: 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 измеризацию 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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 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] 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
- [21] 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.