

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**

Данная работа посвящена исследованию роли конформации пептидной связи пролина в трансмембранным домене рецептора инсулина в контексте механизма активации рецептора.

# Содержание

<b>1 Введение</b>	<b>4</b>
<b>2 Обзор литературы</b>	<b>5</b>
2.1 Рецептор инсулина . . . . .	5
2.1.1 Модели активации IR . . . . .	6
2.2 Трансмембранный домен IR . . . . .	7
2.2.1 Исследование трансмембранного домена . . . . .	7
2.2.2 Экспериментальные данные . . . . .	7
2.2.3 Данные моделирования . . . . .	8
2.3 Пролин в трансмембранных $\alpha$ -спиралях . . . . .	9
2.3.1 Влияние пролина на свойства спиралей . . . . .	9
<b>3 Материалы и методы</b>	<b>10</b>
3.1 Компьютерное моделирование биологических молекул . . . . .	10
3.1.1 Молекулярная динамика . . . . .	10
3.1.2 Классический метод расчета МД для трансмембранного белка .	11
3.1.3 Параметры расчета МД . . . . .	12
3.2 Разработанные алгоритмы обработки траектории МД . . . . .	12
3.2.1 Получение информации о геометрии трансмембранной $\alpha$ -спиралей .	12
3.2.2 Поиск пересечений двух $\alpha$ -спиралей . . . . .	13
<b>4 Результаты и обсуждение</b>	<b>14</b>
4.1 Мономеры с цис- связью . . . . .	14
4.1.1 Исследование геометрии пептида . . . . .	15
4.2 Предсказание структуры димеров с цис- связью . . . . .	18
4.3 Обсуждение результатов . . . . .	21
<b>5 Выводы</b>	<b>23</b>
<b>Список литературы</b>	<b>24</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-динамическая информация, полученная 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 развитие плода человека. Нарушения в работе IR приводят к трудноизлечимым болезням, таким как диабет. Поэтому исследование процесса активации IR - это актуальная задача современной биологии.

Исследование структур, расположенных в липидной мемbrane оказывается трудоемкой задачей для экспериментальных методов, таких как спектроскопия ядерного магнитного резонанса и рентгеноструктурный анализ. 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

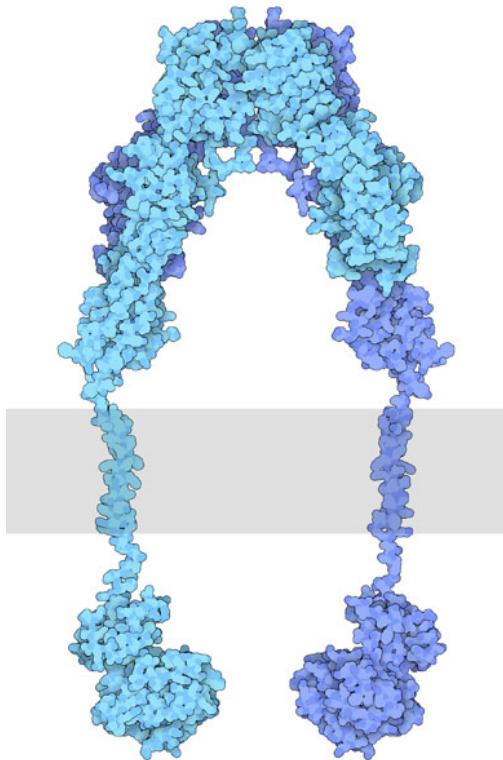


Рис. 1: Схематичное изображение пространственной структуры IR. Внеклеточный домен изображен сверху; внутриклеточный (киназный домен) изображен снизу; мембрана схематично показана серым цветом. <https://pdb101.rcsb.org/motm/182>

Инсулиновый рецептор (IR) - это рецептор, активируемый инсулином и инсулино-подобными факторами роста I и II (IGF-I и IGF-II). Он принадлежит обширному классу рецепторных тирозинкиназ и представляет собой интегральный мембранный белок. Этот белок является димером, состоящим из двух одинаковых молекул, пронизывающих мембрану.

В рецепторе инсулина выделяют внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный (киназный) домены (см 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 реакций внутри клетки.

Одна из ролей IR в организме заключается в регуляции гомеостаза глюкозы. Этот процесс можно кратко описать следующим образом: пища поступает в организм, вследствие расщепления углеводов происходит повышение уровня глюкозы в крови; в ответ на повышение уровня глюкозы вырабатывается гормон инсулин; инсулин связывается

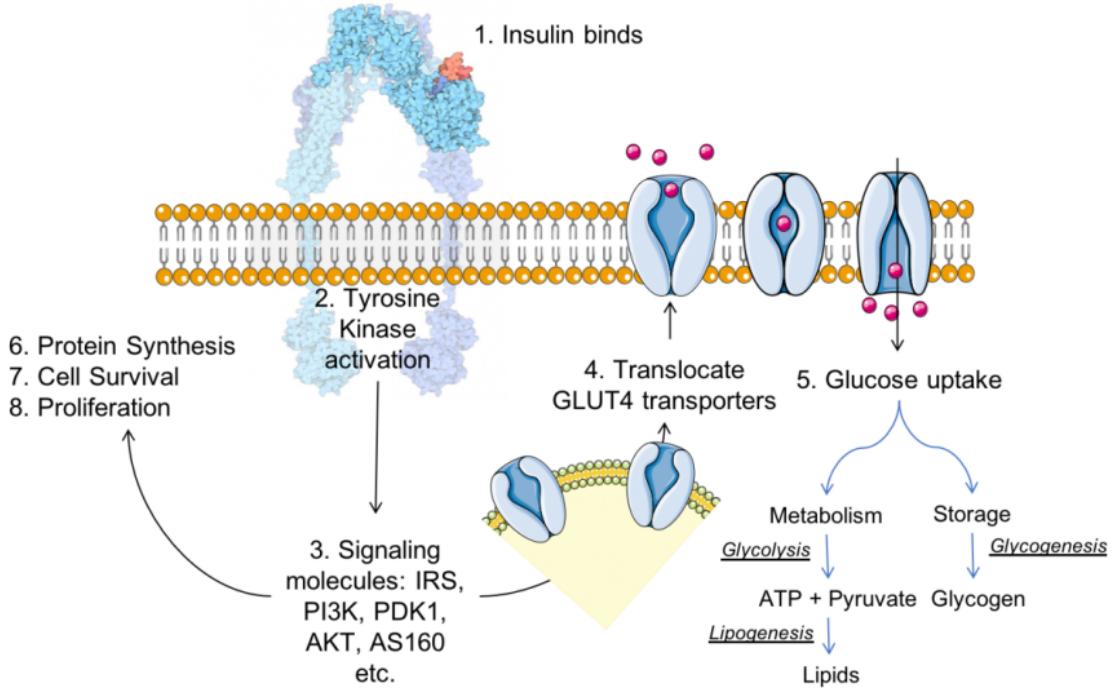


Рис. 2: Схема каскада реакций, запускаемых рецептором инсулина (синий) в результате связывания с инсулином (красный). <https://pdb101.rcsb.org/global-health/diabetes-mellitus/drugs/insulin/insulin-receptor>

с внеклеточным доменом рецептора; происходит передача сигнала внутрь клетки - к внутриклеточному домену; киназный домен запускает каскад реакций, приводящий к увеличению завата глюкозы клеткой. Вследствие этого уровень глюкозы в крови понижается.

Это справедливо для одной из изоформ IR. 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 [2]. В контексте данной работы нас интересует активация IR инсулином, поэтому мы опускаем рассмотрение IR-A.

Поскольку рецептор отвечает за столь важные процессы в организме человека, нарушения в его работе приводят к различным клиническим проявлениям, в том числе к диабету. Поэтому то, как происходит процесс активации IR является актуальным вопросом современной биохимии. Знание этого процесса на молекулярном уровне может послужить базой для создания лекарств на основе структуры белка.

### 2.1.1 Модели активации IR

На данный момент общепринятой моделью активации IR, подтверждающейся экспериментальными данными, является предложенная Lee [5] (см рис. 3С). В данной модели после активации инсулином две части внеклеточного домена "сходятся тем самым

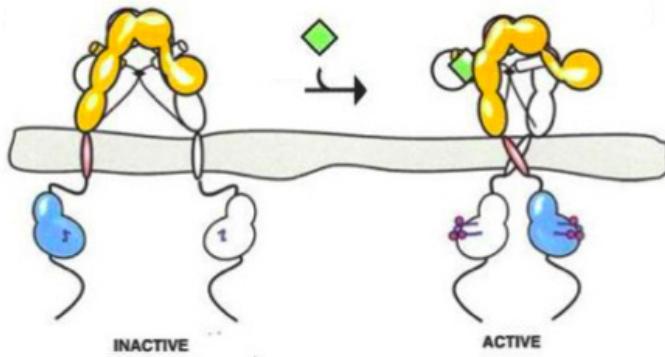


Рис. 3: Модель активации инсулина, основанная на димеризации ТМ домена. [4]

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

В то время как для внеклеточного и киназного доменов возможно подробное исследование структуры экспериментальными методами, в том числе с помощью криоэлектронной микроскопии [3], 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 3.1).

### 2.2.2 Экспериментальные данные

С помощью метода двумерной ЯМР спектроскопии была расшифрована структура ТМ домена IR в мицеллах [6]. Структура для последовательности остатков 940–988 была получена в мицеллах ДФХ (додецилфосфохолина). 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. Мембранный участок имеет структуру  $\alpha$ -спирали. При этом был отмечен кинк в этой спирали, созданный связью Gly960-Pro961, потенциально важный для функции домена.

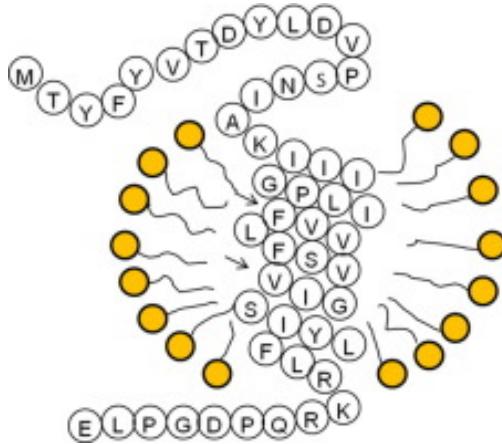


Рис. 4: Схематическое изображение ТМ домена IR в мицелле детергента (желтым указаны головки липидов, буквы обозначают аминокислотный остаток.) [6].

В лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН был проведен аналогичный эксперимент с целью получения димерных форм в мицеллах ДФХ. Был выделен участок 944-973 и созданы образцы мономерных и димерных форм в мицеллах. Спектры показали необычные результаты в отношении кинка Gly-Pro. Спектр мономера двоится в N-концевых остатках, начиная с Pro961. Это говорит об изменении локального окружения этих остатков, что позволяет судить о наличии двух форм мономера, различающихся по форме с N-конца.

В спектре димеров начиная с пролина сигнал троится. То есть, аналогичным образом, существует три конформации димера ТМ домена IR.

TO-DO добавить график вторичной структуры и спектр (если это возможно)

Итак, целью данной работы является предсказание структур, которые были бы согласованы с результатом вышеописанного эксперимента, путем компьютерного моделирования.

### 2.2.3 Данные моделирования

Ранее в лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН были предсказаны наиболее вероятные структуры димеров для ТМ доменов IR [7]. Для получения димеров на основе последовательности мономера был использован программный пакет PREDDIMER [8].

Структуры димеров, полученные с помощью PREDDIMER, затем были помещены в мембранные окружение из молекул пальмитоилолеилфосфатидилхолина (POPC), проведена минимизация энергии, релаксация и расчет траектории молекулярной динамики (3.1.2). Затем были предложены 3 наиболее стабильные димерные структуры. Все они имеют характерную водородную связь Ser969-Ser969.

TO-DO добавить картинку этих структур из диплома Мифтаха (если это возможно)

## 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 спиралами водорастворимых белков [9], [10]. Кроме того, было показано, что внесение мутаций в Pro в ТМ домене транспортных белков приводит к их деактивации [11]. Все это дает основание полагать, что пролин может быть функционально важен трансмембранных доменах большого количества белков.

Как компьютерное моделирование, так и экспериментальные данные показывают, что пролин вносит конформационные изменения в геометрию ТМ  $\alpha$ -спиралей [13], [12]. Цис-конформация пептидной связи между пролином и предшествующим ему остатком создает излом в  $\alpha$ -спирале, что может изменять ее положение в мембране и, как следствие, меняет функциональные свойства пептида.

Также было замечено, что пролин в трансмембранных спиралях имеет достаточно консервативное положение: он чаще всего оказывается "вытащен" в область полярных головок молекул липидов, составляющих мембрану [14]. Такое специфическое положение в свою очередь имеет связь с процессом димеризации ТМ спиралей. Так, с помощью поиска мотивов, образующих водородные связи в димерах, было исследовано, что пролин, находящийся в гидрофильной области ТМД (трансмембранныго домена) индуцирует димеризацию мономеров в мембране [15]. 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 кецептор, подобный рецептору инсулина, (IRR). В ТМ доменах всех трех белков присутствует пролин в гидрофобной части.

### 3 Материалы и методы

#### 3.1 Компьютерное моделирование биологических молекул

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

##### 3.1.1 Молекулярная динамика

Молекулярная динамика (MD) - один из методов атомистического моделирования. Он заключается в решении уравнений движения системы  $N$  взаимодействующих атомов:

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

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  $t_0, t_0 + \Delta t, t_0 + 2\Delta t, \dots, t_1$  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. Система 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 (RMSD), либо по временному промежутку (RMSF). Усреднение по атомам позволяет оценить стабильность структуры в целом, а усреднение по времени позволяет отсле-

---

<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.

живать участки повышенной подвижности структуры, которые часто играют большое значение в функции молекулы.

Описанный выше функционал реализуется открытыми программными пакетами. В настоящей работе используется пакет Gromacs.

### 3.1.2 Классический метод расчета MD для трансмембранных белков

Основные стадии вычислительного эксперимента для мембранных белков 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 нужным значениям температуры и давления.
- Рассчет траектории MD.
- Оценка стабильности.
- Обработка полученных результатов.

Изначально, белок и мембрана<sup>2</sup> представлены в виде отдельных файлов, содержащих информацию о координатах каждого атома и принадлежности к определенной группе. Поскольку ТМ белок не существует без мембранного окружения, а мембрана является сложной стабилизированной системой, возникает проблема погружения белка в мембрану. Для решения этой проблемы используется подход InflateGRO [17].

Мембрана растягивается в ширину в 4 раза и совмещается с белком. Те липиды, которые попали в пересечение с молекулой белка, удаляются. После этого мембрана постепенно сжимается с коэффициентом 0.95 с минимизацией энергии на каждом шаге, пока не достигнет своей стандартной плотности.

---

<sup>2</sup>В связи с достаточно однородной структурой строения мембраны как липидного бислоя, расчет мембранных белков всегда проводится в периодических граничных условиях. Таким образом, файл хранит небольшой участок бислоя, который самостабилизирован так, как если бы бислон был бесконечен. Это является преимуществом исследования мембранных белков с помощью моделирования, в отличие от экспериментальных методов, в которых используются мицеллы, кубическая липидная фаза и т.д.

На следующем шаге происходит минимизация энергии алгоритмом градиентного спуска. После этого с помощью специальных алгоритмов термостата и баростата в коротком прогоне молекулярной динамики происходит релаксация системы к определенной температуре и давлению. Отрелаксированная система готова к расчету траектории MD.

После получения итоговой траектории проводится ее визуальная оценка с помощью программ визуализации. Затем вычисляется RMSD и RMSF, по которым окончательно можно судить о стабильности белка в мембране.

### 3.1.3 Параметры расчета МД

TO-DO добавить таблицу.

## 3.2 Разработанные алгоритмы обработки траектории МД

### 3.2.1 Получение информации о геометрии трансмембранный $\alpha$ -спиралей

Необходимым аппаратом в исследовании трансмембранных  $\alpha$ -спиралей является обработка информации о геометрических характеристиках спиралей в мембране: наклон спиралей относительно перпендикуляру к мембране, изломы спиралей, ориентация и т.д. Для решения подобных задач был разработан специальный алгоритм.

Идеальный виток  $\alpha$ -спиралей, ориентированный по оси Z (ось Z перпендикулярна плоскости мембраны), методом наименьших квадратов фитится на соответствующий участок трансмембранный спиралей. Результатом фита является матрица поворота витка в пространстве. Данная матрица содержит всю информацию о геометрии данного участка спиралей. Получая такие матрицы для витков по всей длине спиралей, можно установить геометрические характеристики всего пептида.

В данной работе этот алгоритм применяется для определения угла наклона спиралей относительно перпендикуляра к плоскости мембраны и для отслеживания изломов спиралей. Для определения угла наклона, единичный вектор, направленный вдоль оси Z, умножается на матрицу поворота, тогда проекция полученного вектора на ось Z определяет косинус угла наклона спиралей (см. рис. 5a). Для отслеживания излома спиралей, каждый полученный вектор вычитается из предыдущего. В итоге, модуль этой разности показывает наличие излома на данном участке спиралей (см. рис. 5b).

Естественным образом, из вышеописанного модуля разности можно также рассчитать угол излома  $\varphi$ :

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

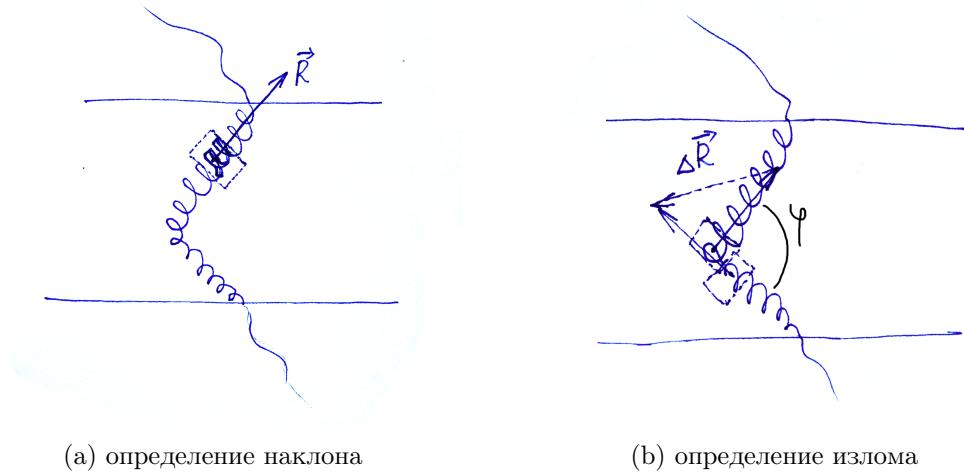


Рис. 5: Схема обработки геометрических данных трансмембранный  $\alpha$ -спиралей

Для реализации всех алгоритмов была использована вспомогательная библиотека MDAnalysis (<https://www.mdanalysys.org>).

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

С помощью последовательного наложения витка  $\alpha$ -спиралей 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 средней ширине  $\alpha$ -спиралей: 1.5 нм.

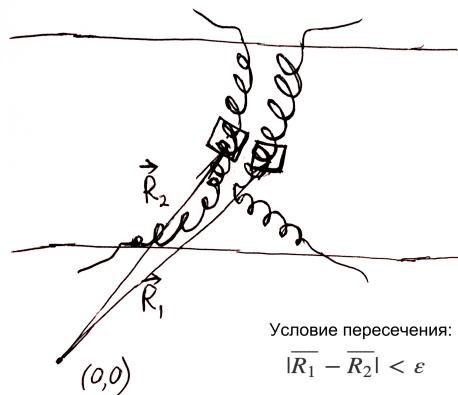


Рис. 6: Схема определения пересечений между мономерами в модельном димере.

## 4 Результаты и обсуждение

### 4.1 Мономеры с цис- связью

Для получения структуры мономера с цис-конформацией пептидной связи Gly-Pro эта пептидная связь была повернута на 180° в мономере, полученном в [6] с помощью программы Rymol<sup>3</sup>.

В процессе расчетов было замечено, что длина внешних свободных участков сильно влияет на структуру пептида. Поэтому расчет проводился как для "коротких" пептидов с обрезанными свободными участками цепи с N и C концов (Ser949-Arg979), так и для "длинных" (Val941-Gly983). Полученные структуры показаны на рис. 7.

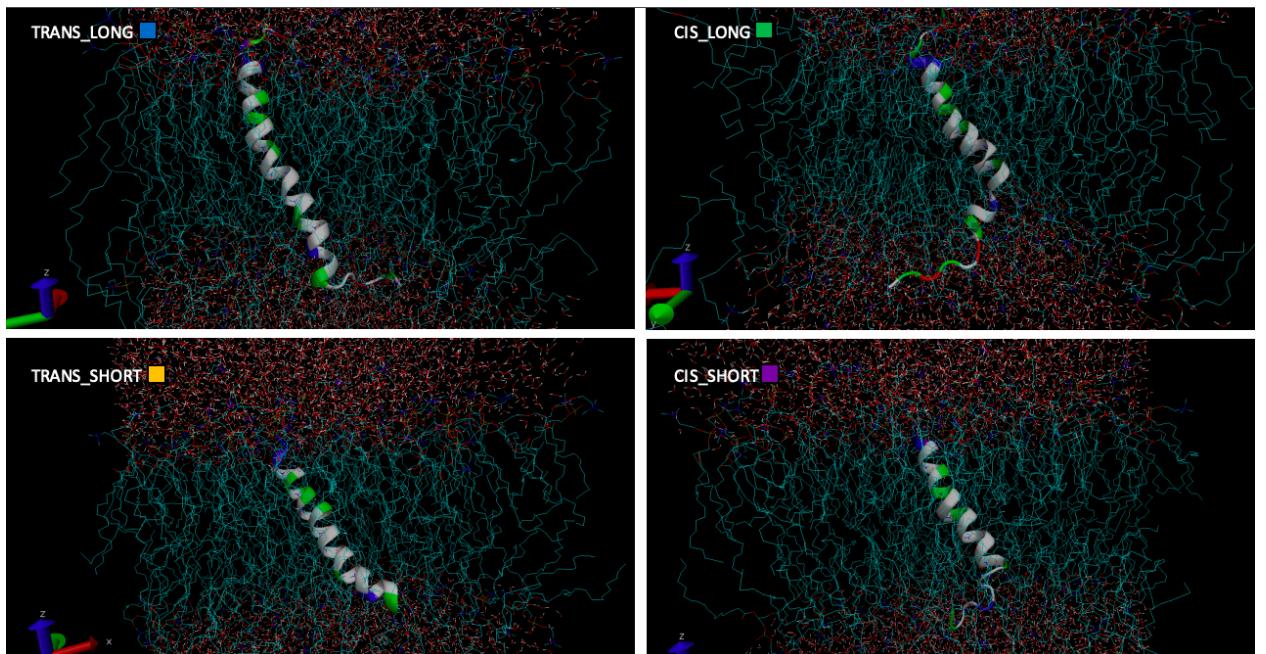


Рис. 7: Стабильные структуры мономеров. Слева направо: референсный длинный пептид с транс конформацией, длинный пептид с цис конформацией, короткий пептид с транс конформацией, короткий пептид с цис конформацией.

Ниже представлены графики RMSD и RMSF (см. раздел 3.1.1) для всех четырех пептидов. По графикам RMSD (рис. 8) можно видеть, что исследованные пептиды стабильны в мембранном окружении, т.к. график каждого пептида выходит на плато.

По графикам RMSF (рис. 9) можно сравнить подвижность соответствующих остатков основной цепи в случае цис и транс конформации. Интересно заметить, что в случае короткого транс пептида существует сильная флюктуация в области связи Gly957-Pro958. Это значит, что, ввиду большой подвижности, эта область является нестабиль-

<sup>3</sup>Т.к. пептидная связь является идеально жесткой в поле GROMOS 43a2x, после искусственного изменения угла пептидной связи этот угол сохранится в процессе расчета траектории МД.

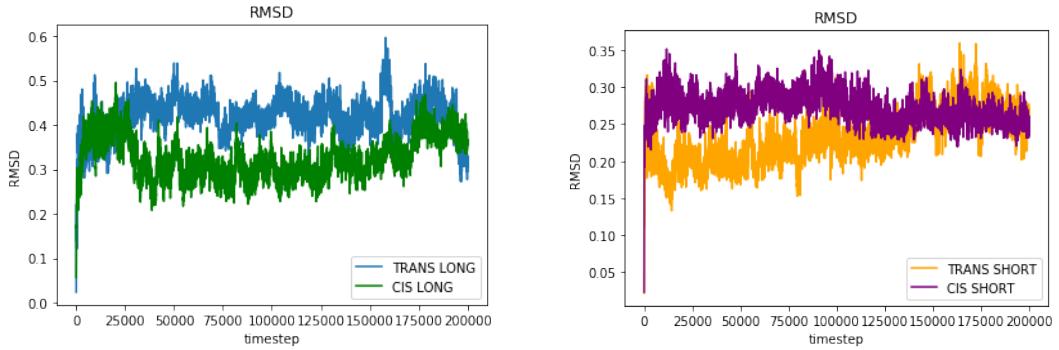


Рис. 8: Графики RMSD четырех пептидов разных конформаций.

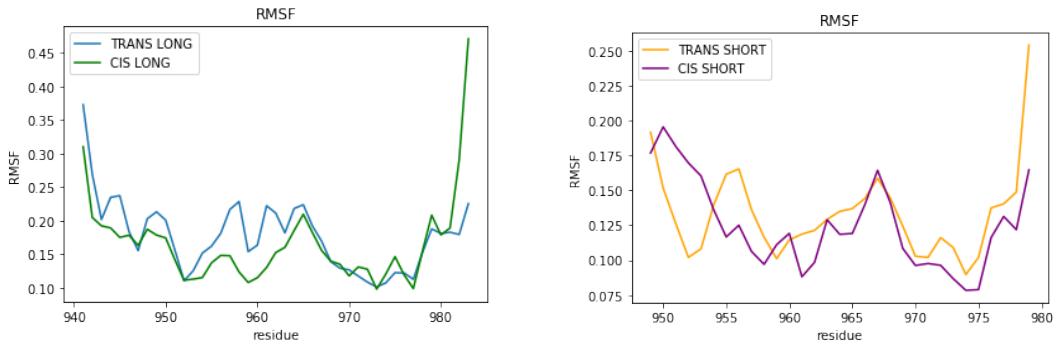


Рис. 9: Графики RMSF четырех пептидов разных конформаций.

ной. В длинном транс пептиде, из-за дополнительного уравновешивания длинным внешним участком, такого эффекта не наблюдается.

#### 4.1.1 Исследование геометрии пептида

С помощью алгоритма, описанного в разделе 3.2.1, была проведена обработка результатов траектории МД с целью выявления закономерностей в геометрии разных конформаций пептида (см. рис. 10, 11).

Графики 10 и 11 были получены путем наложения идеального витка  $\alpha$ -спирали на участок пептида. Такое наложение было проведено по всей длине пептида для каждого остатка. Такие данные были получены для каждого фрейма траектории на стабильном участке, и посчитано среднее значение по траектории.

На графиках наклона показана проекция на ось Z вектора  $(0,0,1)$ , повернутого согласно матрице поворота, полученной при наложении витка спирали на область пептида. Можно видеть, что пептид TRANS LONG (длинный транс пептид) является прямым и стоит вертикально в мембране (проекция  $\approx 1$ ). Пептиды CIS LONG и TRANS SHORT имеют наклон относительно оси Z. Также, по красному графику RMSD наложения витка можно видеть, что в области Pro958 пептида CIS LONG предположительно есть перелом - виток не зафитился на искривленный участок. У пептида CIS SHORT

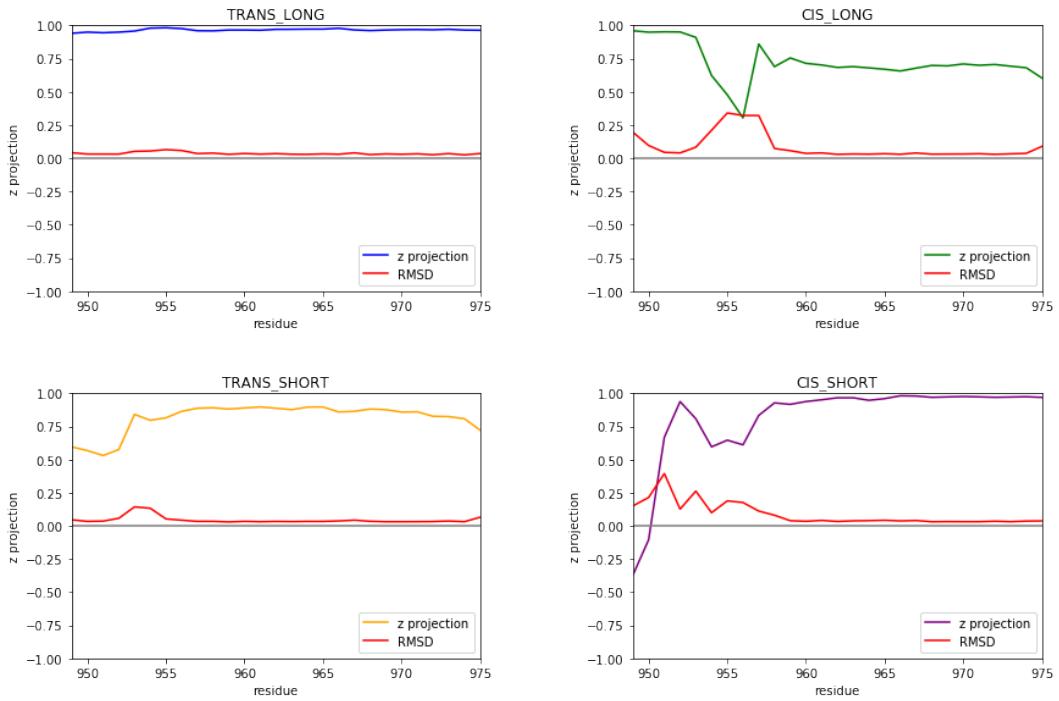


Рис. 10: Графики наклона  $\alpha$ -спиралей в зависимости от остатка (красным обозначен график RMSD наложения витка  $\alpha$ -спиралей на участок пептида).

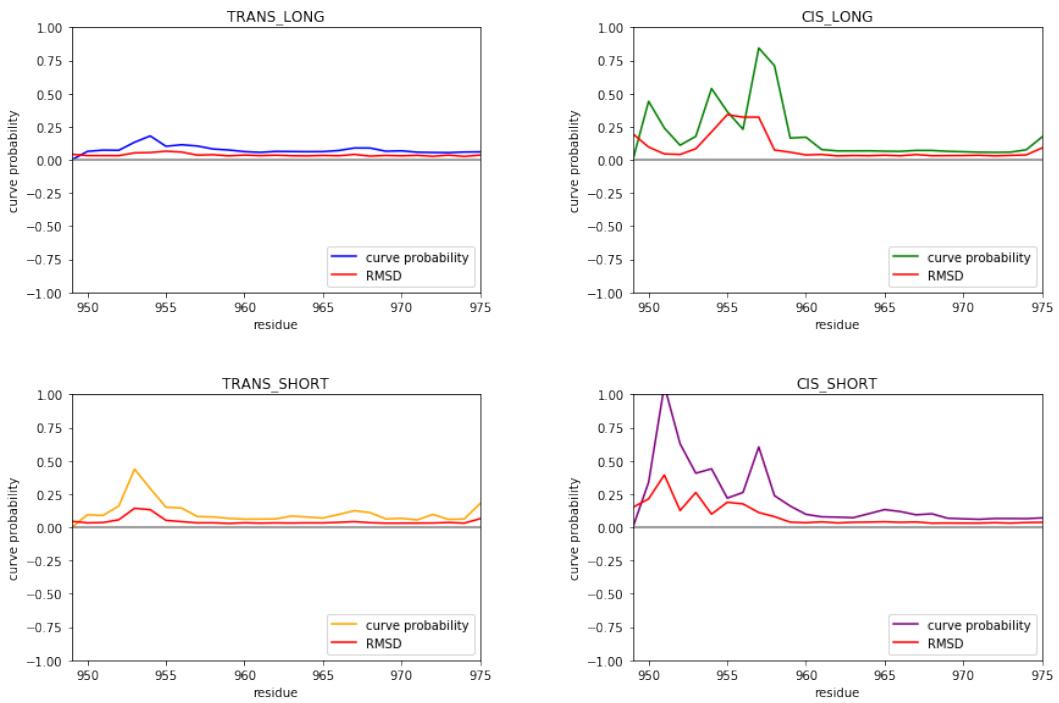


Рис. 11: Графики изломов  $\alpha$ -спиралей в зависимости от остатка (красным обозначен график RMSD наложения витка  $\alpha$ -спиралей на участок пептида).

можно видеть развернутую область с N конца после остатка пролина.

(TODO Как нормально переписать абзац выше???)

По графикам излома можно видеть, что у пептида CIS LONG самый большой излом

присутствует в области связи Gly957-Pro958. Аналогичный излом можно видеть и у CIS SHORT на неразвернутом участке.

Далее, с помощью формулы (3.2.1) была дополнительно получена зависимость угла излома  $\alpha$ -спирали пептидов в области связи Gly957-Pro958 от времени симуляции (рис. 12). Можно видеть, что у транс-пептидов нет излома (угол  $\approx 180^\circ$ ), а у цис-пептидов 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 с цис-связью.

Из полученных данных можно сделать вывод, что цис-конформация пептидной связи Gly957-Pro958 создает излом в трансмембраной  $\alpha$ -спирале пептида TM домена IR. При этом, наличие или отсутствие внешних участков сильно влияет на структуру пептида, что согласуется с предположением о том, что конформационные изменения в TM домене IR индуцируются через внешние участки, соединяющие TM домен с внеклеточным и киназным доменами.

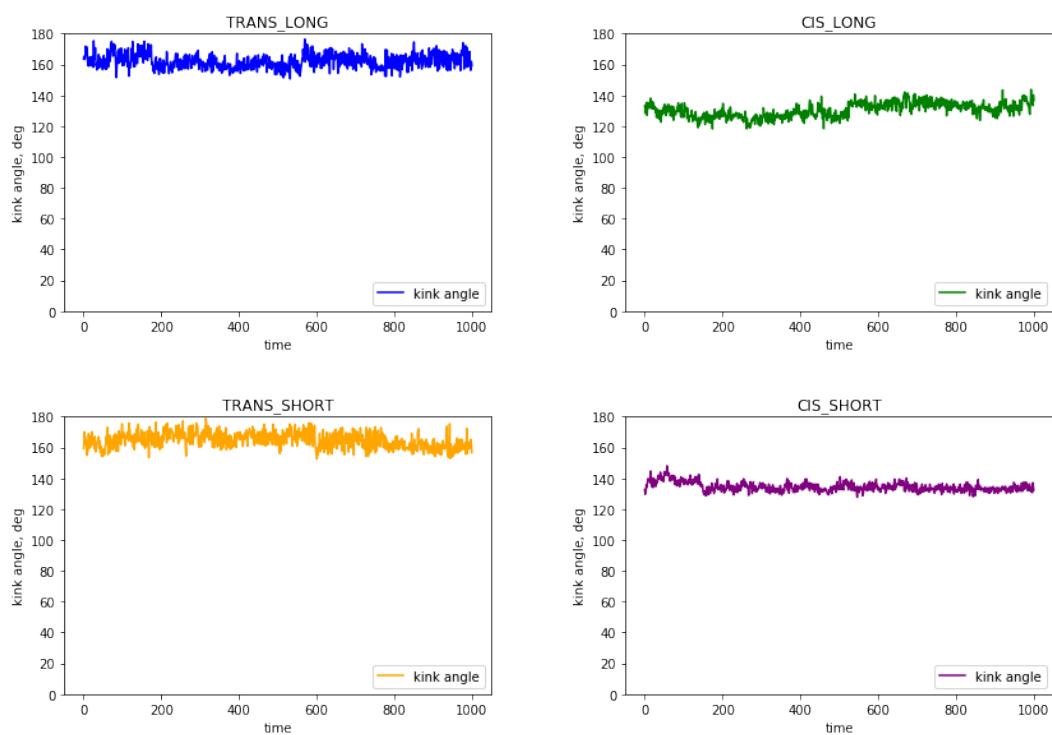


Рис. 12: Графики угла излома  $\alpha$ -спирали в зависимости от времени в траектории МД.

## 4.2 Предсказание структуры димеров с цис- связью

В разделе 4.1 было обнаружено, что структура в области Pro961 является жесткой. Это накладывает геометрическое ограничение на возможные структуры димеров с цис-связью. Так, если соединять мономеры по с неподходящим профилем димеризации, то мономеры в димере могут пересекаться, как схематически отображено на рис. 13

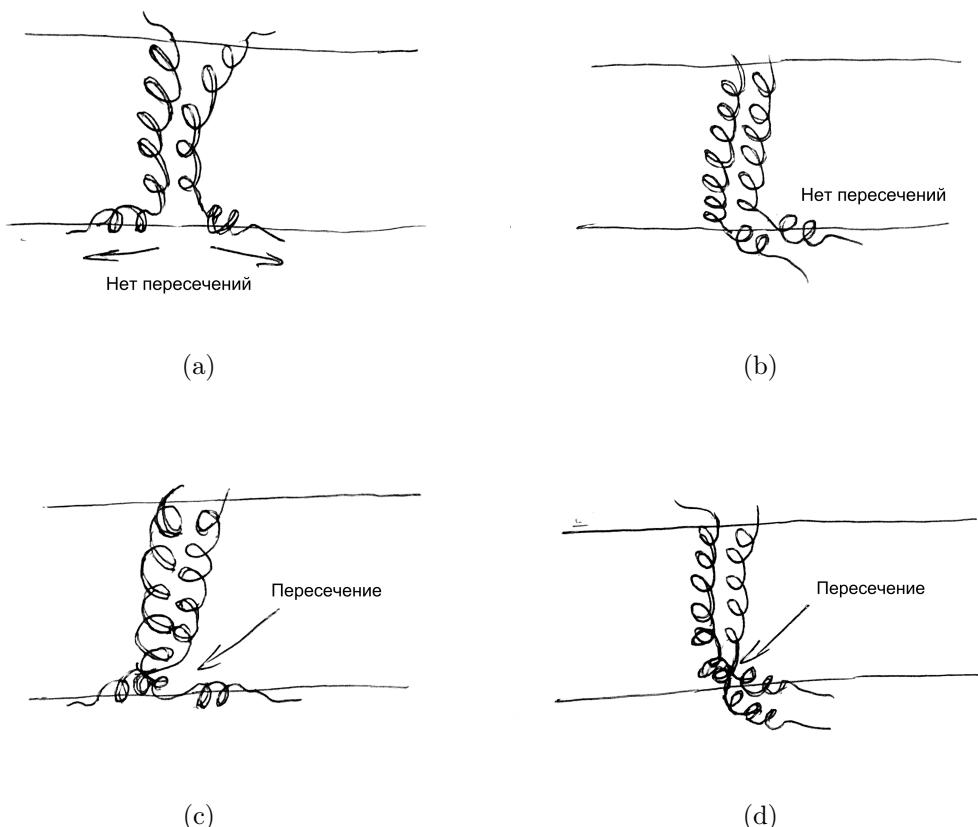


Рис. 13: Схема пересечений жестких мономеров в димерах. Димеры а, б - без пересечений, димеры с, д - есть пересечения.

Был проведен эксперимент с целью отбора возможных структур димеров с цис-транс, транс-цис и цис-цис пептидной связью Gly-Pro. За основу были взяты димеры, полученные в работе (ТО-ДО как сослаться на диплом или новую статью?) С помощью программного пакета Gromax был проведен фит структуры мономера CIS LONG (см. раздел 4.1) на соответствующую часть димера по совпадающей части (Ple960-Lys978). Далее методом, описанном в разделе 3.2.2 были выявлены пересечения двух спиралей димеров между собой. Результаты работы скрипта представлены в таблице 1. В таблице показаны найденные пересечения

Очевидно, что структуры, содержащие пересечения, геометрически невозможны в силу жесткости мономера. Для структур без пересечений был поставлен эксперимент

Таблица 1: Пересечения мономеров в димерах с ЦИС конформацией

Номер профиля димеризации	Пересечения (номера остатков)		
	CIS-TRANS	CIS-CIS	TRANS-CIS
1	-	954	-
2	-	-	-
6	959	952	-
7	-	-	-
8	-	949	-

для получения траектории молекулярной динамики (см. раздел 3.1.2).

В силу предположения о том, что димеризация происходит для цис-мономеров (см. 2.3.1), далее нас интересуют только цис-цис димеры. Как видно из таблицы 1, это цис-цис димеры, полученные из структур с интерфейсом димеризации 2 и 7.

Димер 7 при наложении представлял собой несимметричную структуру без пересечений (см рис. 13b). В процессе релаксации спирали димера развернулись, из чего следует вывод, что данный димер нестабилен в мембранном окружении.

Таким образом, была получена единственная структура цис-цис димера, стабильная в мембране (см. рис. 14). Она представляет собой симетричную структуру без пересечений (см. 13a).

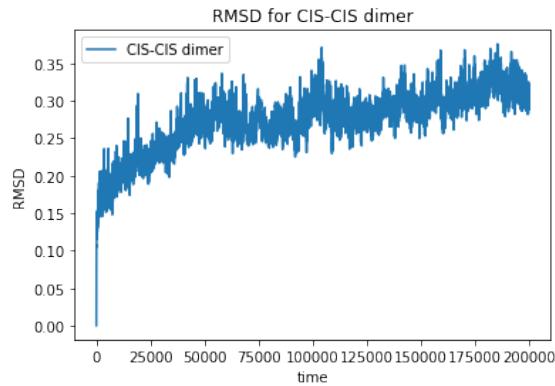


Рис. 14: График RMSD для димера с цис конформацией обоих мономеров.

Далее представлен график RMSF (рис. 15). Для сравнения рядом приведен аналогичный график для транс-транс димера, на базе которого был получен данный цис-цис димер. По графику RMSF можно сделать вывод, что ЦИС-ЦИС димер более стабилен, чем аналогичный ТРАНС-ТРАНС димер с таким же профилем димеризации.

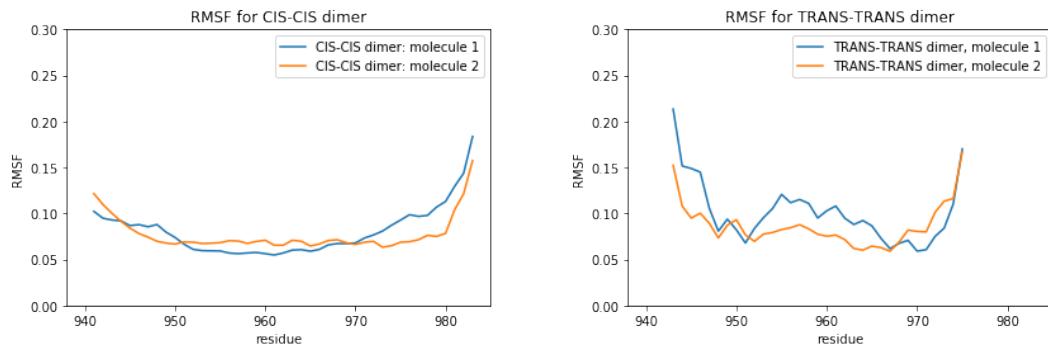
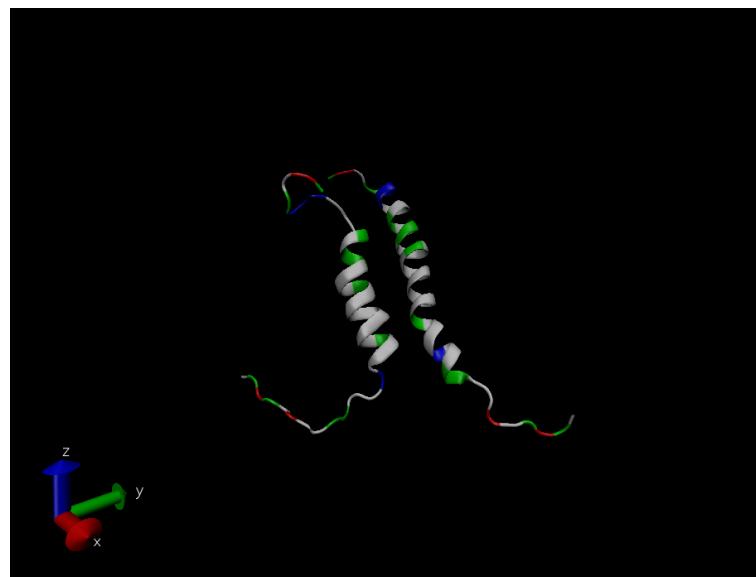
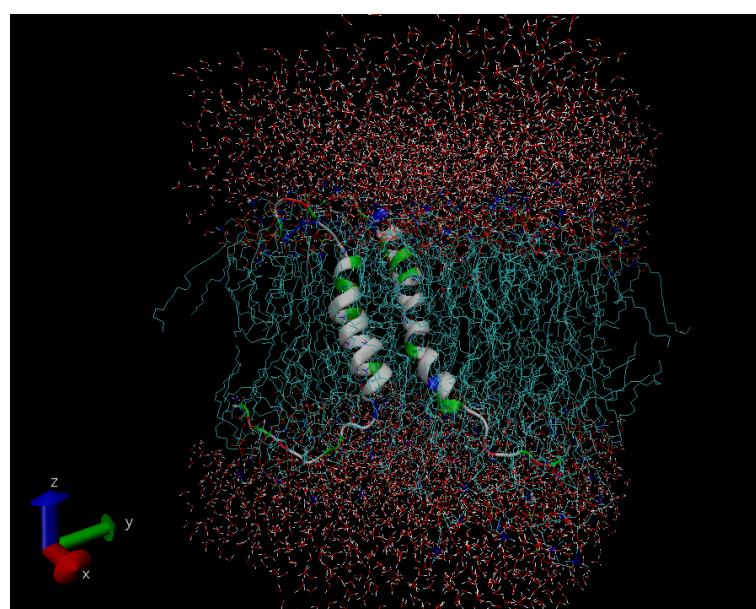


Рис. 15: Графики RMSF димеров одного профиля димеризации с цис-цис и транс-транс конформациями мономеров.



(а) мембрана скрыта



(б) мембрана показана

Рис. 16: 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 (см. раздел 2.3.1)

Отдельно из анализа структурно-динамических свойств мономеров с цис-транс конфигурацией 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 [15], возникает идея о том, что димеризация происходит, когда мономеры принимают цис-конформацию. Таким образом, в неактивной форме IR (см. рис. 3) за счет изменений во внеклеточном домене индуцируется транс-цис переход в мономерах ТМ домена. После этого, вследствие повышенной способности к димеризации, мономеры димеризуются и переходят в состояние цис-цис димера (см. рис. 16). Димеризация оказывается предпочтительной в том числе потому, что из-за геометрического излома ТМ участки оказываются приближены друг к другу (TO-DO ссылка на картинку - надо нарисовать). 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).

TO-DO нарисовать схему предложенного процесса димеризации.

Описанная выше модель активации основана на предположении о том, что в процессе активации ТМ домен работает симметрично: изомеризация мономеров происходит одновременно и мономеры не оказываются в различных состояниях и 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.

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 мембрана, в которой производились расчеты (из молекул ПОФХ - пальмитоилолеилфосфатидилхолина) является слишком узкой для ТМ домена IR. IR и другие рецепторы семейства IR обычно расположены в липидных рафтах - утолщенных участках мембранны, укрепленных гликосфинголипидами и холестерином [18]. Из этого следует, что реальные свойства ТМ домена в жизни могут

значительно отличаться от полученных и подобные исследования должны быть проведены с учетом специфических свойств мембранны.

## 5 Выводы

По результатам работы можно кратко выделить основные выводы:

- Мономеры ТМ домена IR с цис-конформацией пептидной связи Gly957-Pro958 стабильны в мембранном окружении и могут существовать в природе. Цис-конформация пептида меняет его геометрические свойства: в области пептидной связи образуется излом и пролин оказывается вытянут к гидрофильным головкам мембранны.
- Подвижность мономеров в области связи Gly957-Pro958 с цис и транс конфигурациями пептидной связи зависит от длины внешних участков с N и C конца.
- Пептид с цис- конформацией пептидной связи Gly957-Pro958 является жестким в области этой связи.
- Существует стабильный димер ТМ домена IR с цис конфигурациями обоих мономеров. Этот димер имеет симметричную структуру с удаленными друг от друга N концами, лежащими на границе мембранны в области гидрофильных головок фосфолипидов.

Существование димера с цис-цис конфигурацией позволяет предположить возможность механизма антивации IR, основанного на цис-транс переходе в 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] 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
- [3] 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.
- [4] 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).
- [5] Lee J, Miyazaki M, Romeo GR and Shoelson SE. Insulin receptor activation with transmembrane domain ligands. J Biol Chem 289: 19769-19777 (2014)
- [6] 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
- [7] 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.
- [8] Polyansky A. A. et al. PREDDIMER: a web server for prediction of transmembrane helical dimers //Bioinformatics. – 2014. – Т. 30. – №. 6. – С. 889-890.
- [9] 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
- [10] 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
- [11] Slepkov 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
- [12] Cordes FS, Bright JN, Sansom MSP. Proline-induced distortions of transmembrane helices. J Mol Biol 2002; 323: 951–960

- [13] L.K. Iyer, S. Vishveshwara A model for transmembrane helix with a cis-proline in the middle FEBS Lett., 374 (1995), pp. 21-24
- [14] 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
- [15] 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
- [16] 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)
- [17] 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
- [18] 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. – Т. 1861. – №. 4. – С. 819-826.