

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.150.2

### СТРУКТУРА $\beta$ - $\beta$ -ШПИЛЕК, ЗАМКНУТЫХ В ЦИКЛЫ S-S-МОСТИКАМИ

© 2010 г. Е. В. Бражников, А. В. Ефимов\*

Институт белка Российской академии наук, Пущино, Московская обл., 142290

Поступила в редакцию 16.09.2009 г.

Принята к печати 05.11.2009 г.

Выполнен стереохимический анализ белков, содержащих  $\beta$ - $\beta$ -шпильки с S-S-мостиками. Создана база данных таких белков, включающая в себя 428 файлов из Банка белковых данных PDB. Всего в негомологических белках найдено 390  $\beta$ - $\beta$ -шпилек, замкнутых в циклы S-S-мостиками. В 118 шпильках S-S-мостики образованы между цистеинами, расположенными напротив друг друга в соседних  $\beta$ -тяжах. Из них 110 являются левыми  $\beta$ - $\beta$ -шпильками, если смотреть со стороны S-S-мостиков, и только 8 – правыми. В 272 шпильках S-S-мостики находятся между цистеинами, один из которых расположен в  $\beta$ -тяже, а другой в петле, примыкающей к  $\beta$ - $\beta$ -шпильке либо с N- (84%), либо с C-конца (16%). При этом в подавляющем большинстве случаев участок полипептидной цепи, замкнутый в цикл S-S-мостиком, образует в пространстве виток левой суперспирали.

**Ключевые слова:** белки,  $\beta$ -тяж,  $\beta$ -поворот, конформация, стереохимический анализ, хиральность.

**STRUCTURE OF  $\beta$ - $\beta$ -HAIRPINS CLOSED INTO CYCLES BY S-S-BRIDGES**, by E. V. Brazhnikov, A. V. Efimov\* (Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia, \*e-mail: efimov@protres.ru). In the present study, a stereochemical analysis of proteins containing  $\beta$ - $\beta$ -hairpins closed into cycles by S-S-bridges has been performed. A database of these proteins has been compiled from the Protein Data Bank (total 428 PDB entries). 390  $\beta$ - $\beta$ -hairpins closed into cycles by S-S-bridges have been found in non-homologous proteins included into the database. Analysis showed that 118 hairpins contain S-S-bridges formed by cysteins located opposite to each other in the neighboring  $\beta$ -strands. Among them, 110 hairpins are left-turned and 8  $\beta$ -hairpins are right -turned when viewed from the same side where S-S-bridges are located. In the other group of 272  $\beta$ -hairpins, the S-S-bridge is formed by two cysteins one of which is located in the  $\beta$ -strand and the other in the loop juxtaposed to the  $\beta$ -hairpin at the N- (84%) or C-terminus (16%). As shown, in most cases the loop-hairpin region closed into a cycle by the S-S-bridge forms a turn of a left-handed superhelix.

**Key words:** proteins,  $\beta$ -strand,  $\beta$ -turn, conformation, stereochemical analysis, handedness.

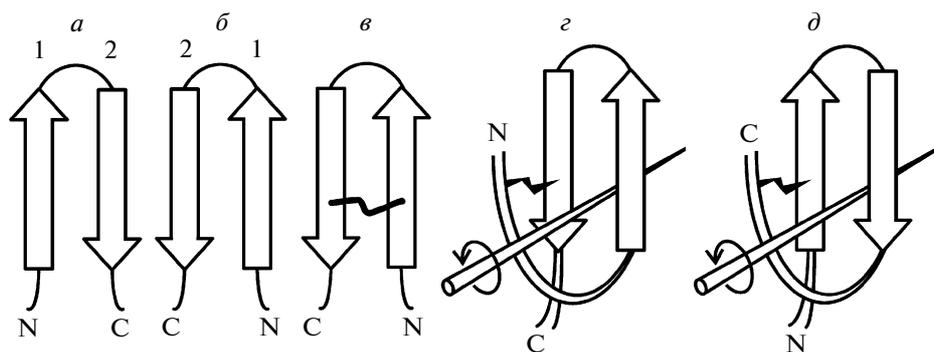
#### ВВЕДЕНИЕ

$\beta$ - $\beta$ -шпилька – это структурный мотив, образованный двумя соседними по цепи  $\beta$ -тяжами, которые сложены сами на себя и образуют антипараллельную  $\beta$ -структуру.  $\beta$ - $\beta$ -шпильки широко распространены в белках и встречаются как в изолированном виде, так и в составе многотяжевых  $\beta$ -листов.  $\beta$ - $\beta$ -шпильки могут быть правыми и левыми, если смотреть на них с одной стороны (например, со стороны гидрофобного ядра). В правых шпильках второй по цепи тяж располагается справа относительно первого (рис. 1а), а в левых – слева (рис. 1б). Плоские  $\beta$ - $\beta$ -шпильки встречаются редко, и в белках они так же как большинство  $\beta$ -листов скручены с образованием правопропеллерной структуры [1]. Многие  $\beta$ - $\beta$ -шпильки в белках скручиваются и изгибаются очень сильно, что

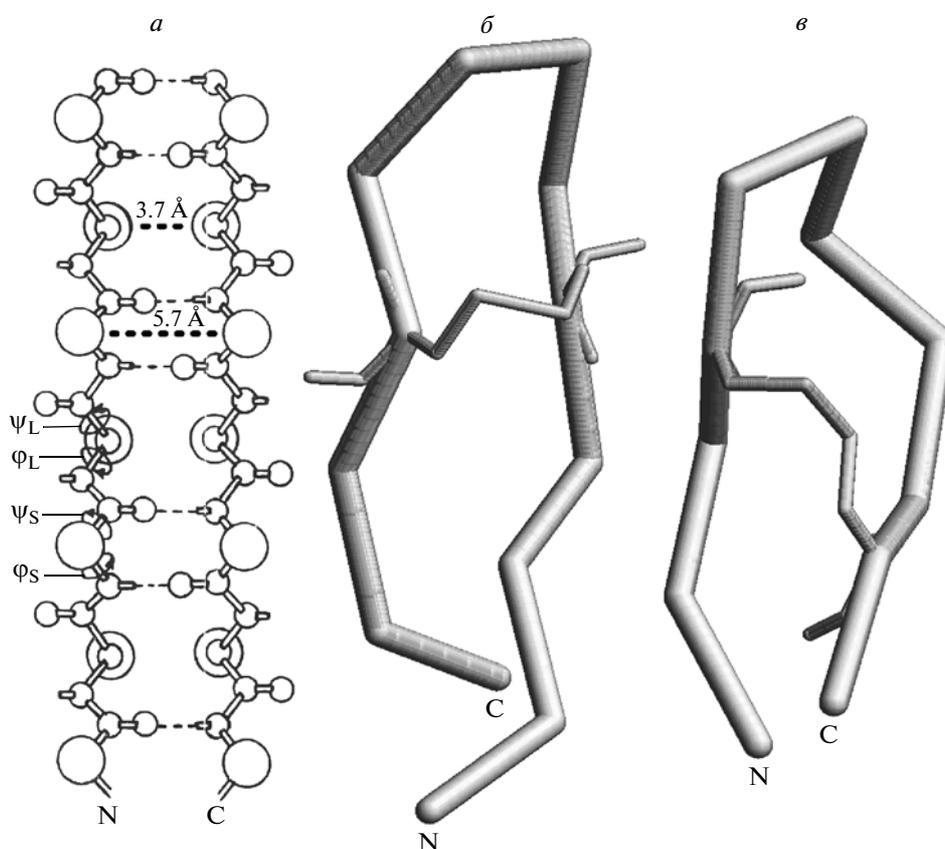
приводит к образованию своеобразной двойной спирали, имеющей вогнутую и выпуклую поверхности. Такие двойные суперспирали образуются всегда правыми шпильками, если смотреть с вогнутой стороны [2]. Длинные  $\beta$ - $\beta$ -шпильки могут сложиться сами на себя, образуя  $\beta$ - $\beta$ -уголок, и такие шпильки – тоже правые, если смотреть со стороны вогнутой поверхности [2].

В настоящей работе мы провели анализ структуры  $\beta$ - $\beta$ -шпилек, замкнутых в циклы S-S-мостиками. Оказалось, что подавляющее большинство шпилек, в которых S-S-мостики образованы цистеинами, расположенными в соседних  $\beta$ -тяжах напротив друг друга, являются левыми шпильками, если смотреть на них со стороны S-S-мостиков. Если же S-S-мостики находятся между цистеинами, один из которых находится в  $\beta$ -тяже, а другой в петле, примыкающей к шпильке с N- или C-конца, то в таких структурах участок цепи, замкнутый в цикл

\* Эл. почта: efimov@protres.ru



**Рис. 1.** Схематическое изображение правой (а) и левой (б)  $\beta$ -шпилек, левой  $\beta$ -шпильки, замкнутой в цикл S-S-мостиком между  $\beta$ -тяжами (в), а также левых суперспиралей, образованных  $\beta$ -шпильками и петлями, примыкающими к ним с N-конца (г) или C-конца (д). Воображаемые оси вращения в суперспиралях показаны стержнями,  $\beta$ -тяги — стрелками.



**Рис. 2.** Фрагмент плоской антипараллельной  $\beta$ -структуры, состоящей из двух  $\beta$ -тяжей (а), и примеры левой (б, PDB код 1PDK, участок 203–214) и правой (в, PDB код 1LCS, участок 130–140)  $\beta$ -шпилек с S-S-мостиками между  $\beta$ -тяжами. Торсионные углы  $\varphi$ ,  $\psi$  малых и больших циклов показаны индексами S и L соответственно. Расстояния между  $C_{\beta}$ -атомами в циклах показаны пунктиром с соответствующими числовыми значениями.

S-S-связью, образует в пространстве виток левой суперспирали. В работе также рассмотрены возможные причины такой хиральности.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Создана база данных белков, содержащих замкнутые в циклы S-S-мостиками  $\beta$ -шпильки: из Банка

белковых данных (PDB) с помощью программы OCA (адрес сервера <http://www.ebi.ac.uk/>) отобрано 13845 белков, содержащих S-S-мостики. Из них выбрали 2199 белков с гомологией по аминокислотной последовательности не более 60%. Из этих белков визуально с помощью программы RasMol [3] выбрали 428 белков с  $\beta$ -шпильками, замкнутыми S-S-мостиками. В этом наборе белков анализировали только

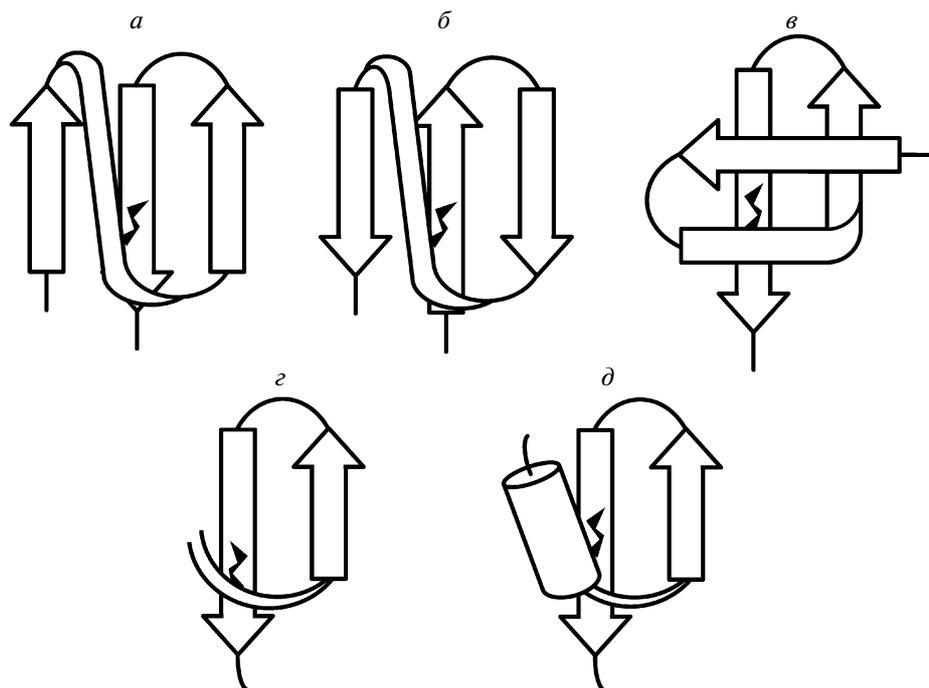
<i>a</i>		
$\beta\beta\beta\beta\beta\beta\beta\beta\beta\beta\beta\alpha_L\alpha_L\beta\beta\beta\beta\beta\beta\beta\beta\beta\beta$		
1CW6 : A	--HC-----TKSG-----CS--	H8-S15
1J48 : A	--QCAP----VGGQ-----DAC---	Q33-C43
1MKF : A	---CALQMTSHDGVWTSTSSSEQC---	C318-C337
1MTZ : A	---CIENYAKVNGI--YIYYKLC---	C5-C22
1QNX : A	EVGCGS I KY I QEKW--HKHYLVCNYG	E167-G190
1U5M : A	-R I CVC----DTGT-----VLCDD-	R29-D42
1XKU : A	---CQC----HLRV-----VQC---	C29-C38
1ZRH : A	---CLR----DSGR-----DRC---	C223-C232
2COV : D	NYVC-----LNDY-----CLP-	N410-P420
2DQA : A	---CRM----DVG S-----LSC---	C27-C36
2HTY : H	--AC-----VNGS-----CFT-	A231-T239
2HTY : F	--SCYP----NAGE-----ITCV--	S279-V290
Консенсус	--C-----G-----C---	
<i>б</i>		
$\beta$		
1PDK : A	SF I C--NGSR--CSV--	S204-V214
1U79 : A	-AGC--K GGS--CL I--	A104-T113
1WWL : A	---CELDEESCSCN---	C8-N18
1Y9Z : A	--ECTVNGTSFSC----	E259-C269
2A74 : C	-KLC--RDEL--CRC--	K1482-C1491
2GRU : A	KQ I C--FADR--CFNFA	K4-A16
2 I FR : A	-TDCSVSGTTVSCSY--	T192-Y205
2CX4 : F	--VC--TKEL--CT---	V48-T55
2NYK : A	RYACLFLGFDV I CDVYH	R100-H116
Консенсус	---C---G---C---	
<i>в</i>		
$\beta$		
1CD9 : B	SNL SCLM----HLTTNS-----LVCQWE	S9-E27
1R4C : A	--AFC S FQ I YAVPWQGTMTLSKSTCQD-	A95-D119
1Z4V : A	-RKSCS I ----STVPGG---CMMYCFV-	R224-V242
2 I D5 : A	----CEC-----SAQDRA-----VLC---	C7-C18
8TFV : A	- I I YC-----NRR TGK-----CQRM	I8-M21
Консенсус	---C-----G-----C---	

**Рис. 3.** Выравнивание аминокислотных последовательностей, кодирующих левые  $\beta$ - $\beta$ -шпильки, замкнутые в циклы S-S-мостиками между  $\beta$ -тяжами. Представлены примеры шпилек с  $\beta\alpha_L\alpha_L\beta$ - (*a*),  $\beta\epsilon\gamma\beta$ - (*б*) и  $\beta\alpha\alpha\gamma\alpha_L\beta$ -поворотами (*в*). Греческими буквами  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  и  $\alpha_L$  показаны конформации остатков в соответствующих столбцах согласно номенклатуре [6]. Слева показаны PDB-коды белков, а справа – участки цепи, образующие шпильки.

ко негомологичные  $\beta$ -шпильки, отобранные с помощью программы BLAST для попарного выравнивания (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) [4]. Всего в негомологичных белках найдено 390  $\beta$ -шпилек, замкнутых в циклы S-S-мостиками.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный нами анализ  $\beta$ - $\beta$ -шпилек с S-S-мостиками между цистеинами, расположенными на соседних  $\beta$ -тяжах, показал, что большинство этих шпилек (110 из 118) – левые, если смотреть на



**Рис. 4.** Примеры структурных мотивов с уникальными укладками цепи и определенной хиральностью, которые включают в себя левые суперспирали типа петля-шпилька и шпилька-петля, замкнутые в циклы S-S-мостиками. См. текст.

них со стороны S-S-мостиков (рис. 1в). Вторая важная особенность этих шпилек состоит в том, что остатки цистеина расположены точно напротив друг друга, т.е. находятся в регистре (рис. 2а,б). Третья особенность — эти цистеины входят в состав так называемых больших циклов, образованных водородными связями [5]. В идеальной плоской  $\beta$ - $\beta$ -шпильке контактные расстояния между  $C_{\beta}$ -атомами в больших циклах равны 3.7 Å, а в малых циклах — 5.7 Å (рис. 2а). В правых  $\beta$ - $\beta$ -шпильках расположенные друг напротив друга остатки  $C_{\alpha}$  входили бы в состав малых циклов. Тот факт, что правых  $\beta$ -шпилек с S-S-мостиками в белках очень мало (8 из 118 шпилек), указывает на то, что образование S-S-мостиков между цистеинами, находящимися в малых циклах, затруднено из-за большого расстояния между их  $C_{\beta}$ -атомами (5.7 Å в плоских шпильках). По-видимому, в этом заключается главная причина того, что большинство  $\beta$ -шпилек этого типа — левые. Стереохимический анализ показал, что при скручивании  $\beta$ -шпилек происходит уменьшение расстояний между  $C_{\beta}$ -атомами остатков, расположенных в малых циклах. Несколько найденных в белках правых  $\beta$ - $\beta$ -шпилек с межтяжевыми S-S-мостиками как раз сильно скручены (см. рис. 2в).

Аминокислотные последовательности, кодирующие  $\beta$ - $\beta$ -шпильки с S-S-мостиками, должны удовлетворять определенным условиям. Прежде всего, должны быть выполнены необходимые условия об-

разования  $\beta$ - $\beta$ -шпилек — каждый тип шпилек должен иметь определенное расположение в цепи ключевых гидрофобных, гидрофильных и глициновых остатков [6–8]. Наиболее четко это прослеживается в шпильках с короткими петлями, в которых  $\beta$ -тяги соединены стандартными  $\beta\beta\alpha_L\beta$ -,  $\beta\epsilon\gamma\beta$ -,  $\beta\beta\alpha_L\alpha_L\beta$ -,  $\beta\alpha\gamma\epsilon\beta$ -,  $\beta\alpha\gamma\alpha_L\beta$ - и  $\beta\alpha\gamma\alpha_L\beta$ -поворотами. На рис. 3 представлены примеры аминокислотных последовательностей левых  $\beta$ -шпилек, замкнутых в циклы S-S-мостиками, в которых  $\beta$ -тяги соединены  $\beta\alpha_L\alpha_L\beta$ -,  $\beta\epsilon\gamma\beta$ - и  $\beta\alpha\gamma\alpha_L\beta$ -поворотами. Выравнивание последовательностей выполнено таким образом, что в столбцах находятся остатки, имеющие одинаковые конформации и занимающие эквивалентные позиции в структурах. Показано, что необходимые условия образования левых  $\beta$ -шпилек выполнены [7, 8]. Кроме этого, взаимное расположение в цепи цистеинов и остатков, образующих  $\beta$ -повороты (прежде всего, это глицины и остатки с гибкими боковыми цепями, занимающие стерически напряженные  $\alpha_L$ - и  $\epsilon$ -позиции), должно быть строго согласованным, так чтобы  $\beta$ -шпилька была левой и остатки цистеинов оказались напротив друг друга в больших циклах.

В другом типе структур, рассмотренных в настоящей работе, S-S-мостики образованы между двумя цистеинами, один из которых находится в  $\beta$ -тяже шпильки, а другой — в петле, примыкающей к шпильке с N- или C-конца (рис. 1з,д). В PDB-банке



входят в состав abcd-единиц [9] с обратным (рис. 4а) и прямым (рис. 4б) ходом полипептидной цепи, в  $3\beta$ -уголки [10] (рис. 4в), а также в abCd-единицы [9, 11] с  $\alpha$ -спиралями в C-участках (часть abCd-единицы показана на рис. 4д; эта часть встречается в белках и как отдельная структурная единица [12]). На рис. 4г для сравнения представлена левая суперспираль типа петля-шпилька в том же ракурсе.

Необходимо отметить, что впервые подобные левые суперспирали обнаружены в семействе обогащенных дисульфидами белков, в которых наблюдали так называемый “дисульфидный крест” [13]. Авторы также обратили внимание на то, что чаще всего такие суперспирали встречаются в abcd-единицах. В настоящей работе мы показали, что такие суперспирали встречаются не только в белках с “дисульфидными крестами”, но и во многих других белковых семействах. С другой стороны, мы существенно увеличили статистику – нами найдено 272 суперспирали, замкнутые в циклы S-S-мостиками, в то время как авторы работы [13] нашли всего 18 примеров. Наконец, авторы работы [13] описали только суперспираль типа петля-шпилька, но, как показано в настоящей работе, в белках встречается и тип шпилька-петля.

Левая форма рассматриваемых суперспиралей определяется также структурой петли, примыкающей к  $\beta$ -шпильке. Так, например, если к левой  $\beta$ -шпильке с N-конца примыкает короткая петля с соответствующей последовательностью, имеющая структуру  $\beta\beta\beta\beta\alpha_L\beta$ -дуги [7], то образуется левая суперспираль, замкнутая в цикл S-S-мостиком. На рис. 5 представлены примеры последовательностей, кодирующих такие суперспирали в известных белках. Отметим, что в первых позициях  $\beta\beta\beta\beta\alpha_L\beta$ -дуг в этих структурах находятся остатки цистеина, в большинстве стерически напряженных  $\alpha_L$ -позиций – остатки Gly, а в одной из  $\beta$ -позиций часто встречаются остатки Pro. Во всех случаях  $\beta$ -шпильки – левые, но конформации  $\beta$ -поворотов и число образующих их остатков могут быть разными. Взаимное расположение остатков Cys строго согласовано с тем, чтобы в структуре они были направлены навстречу друг другу и могли образовать S-S-мостики.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты настоящей работы показывают, что левые  $\beta$ -шпильки, замкнутые в циклы S-S-мостиками между  $\beta$ -тяжами, и левые суперспирали типа петля-шпилька и шпилька-петля, также замкнутые в циклы S-S-мостиками, широко

распространены в негомологичных белках. Каждая из этих структур встречается преимущественно в одной из двух “зеркально-симметричных” форм и имеет уникальную укладку цепи. По-видимому, в сворачивании этих структур важную роль играет образование S-S-мостиков. S-S-мостики не только повышают стабильность  $\beta$ -шпилек и суперспиралей за счет их замыкания в циклы, но и отбирают преимущественно одну форму для каждой из них. Можно предположить, что эти структуры сворачиваются сами по себе, независимо от остальной части белковой цепи и, следовательно, могут быть либо готовыми структурными блоками, либо зародышами в процессе сворачивания содержащих их белков.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-00727) и Федерального агентства по науке и инновациям (02.740.11.0295).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chothia C. 1973. Conformation of twisted  $\beta$ -pleated sheets in proteins. *J. Mol. Biol.* **75**, 295–302.
2. Efimov A.V. 1991. Structure of coiled  $\beta$ - $\beta$ -hairpins and  $\beta$ - $\beta$ -corners. *FEBS Lett.* **284**, 288–292.
3. Sayle R.A., Milner-White E.J. 1995. RASMOL – biomolecular graphics for all. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 374–376.
4. Tatusova T.A., Madden T.L. 1999. Blast 2 sequences – a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**, 247–250.
5. Salemme F.R., Weatherford D.W. 1981. Conformational and geometrical properties of  $\beta$ -sheets in proteins. II. Antiparallel and mixed  $\beta$ -sheets. *J. Mol. Biol.* **146**, 119–141.
6. Ефимов А.В. 1986. Стандартные конформации полипептидной цепи в нерегулярных участках белков. *Молекуляр. биология.* **20**, 250–260.
7. Efimov A.V. 1987. Pseudo-homology of protein standard structures formed by two consecutive  $\beta$ -strands. *FEBS Lett.* **224**, 372–376.
8. Efimov A.V. 1993. Patterns of loop region in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 379–384.
9. Ефимов А.В. 1982. Супервторичная структура  $\beta$ -белков. *Молекуляр. биология.* **16**, 799–806.
10. Efimov A.V. 1992. A novel super-secondary structure of  $\beta$ -proteins. A triple-strand corner. *FEBS Lett.* **298**, 261–265.
11. Efimov A.V. 1995. Structural similarity between two-layer  $\alpha/\beta$  and  $\beta$ -proteins. *J. Mol. Biol.* **245**, 402–415.
12. Kajava A.V. 1992. Left-handed topology of super-secondary structure formed by aligned  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -hairpin. *FEBS Lett.* **302**, 8–10.
13. Harrison P.M., Sternberg M.J.E. 1996. The disulphide  $\beta$ -cross: from cystine geometry and clustering to classification of small disulphide-rich protein folds. *J. Mol. Biol.* **264**, 603–623.