

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.150.2

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ И АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ СИЛЬНО СКРУЧЕННЫХ И ИЗОГНУТЫХ β -ШПИЛЕК В ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКАХ

© 2016 г. Е. А. Бошкова, Е. В. Бражников, А. В. Ефимов*

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

**e-mail: efimov@protres.ru*

Поступила в редакцию 02.10.2015 г.

Принята к печати 14.11.2015 г.

β -Шпильки широко распространены в белках, и их можно встретить как в составе β -листов, так и обособленно. В данной работе проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей β -тяжей в составе сильно скрученных β -шпилек из различных структурных подклассов белков. Сильно скрученная и изогнутая (coiled) β -шпилька образует в пространстве правую двойную спираль из β -тяжей, которые соединены петлевым участком – перетяжкой. Определены частоты встречаемости аминокислотных остатков на внутренней (вогнутой) и внешней (выпуклой) поверхностях сильно скрученных β -шпилек (исследовано 220 β -шпилек из негомологичных белков). Вогнутая поверхность таких β -шпилек образована преимущественно гидрофобными остатками, а выпуклая – гидрофильными, соответственно в их аминокислотных последовательностях наблюдается чередование гидрофобных внутренних и гидрофильных внешних остатков. Во внутренних позициях сильно скрученных и изогнутых β -шпилек аномально часто обнаружены аминокислотные остатки глицина и аланина, особенно в местах наибольшей скрученности тяжей. Установлено, что внутренние позиции никогда не содержат остатков пролина, тогда как внешние позиции в области скручивания содержат их относительно много. Показано, что для образования относительно короткой (до 7 аминокислотных остатков) перетяжки необходим хотя бы один аминокислотный остаток в α_L - или ϵ -конформации. Как правило, эти позиции заняты глицинами. Таким образом, для образования сильно скрученной и изогнутой β -шпилеки необходимо не только чередование гидрофобных и гидрофильных аминокислотных остатков, но и наличие одного-двух остатков глицина в области перетяжки, избыток глицинов и аланинов в местах наибольшей скрученности тяжей на вогнутой поверхности, а также наличие пролинов на выпуклой поверхности.

Ключевые слова: скрученная β -шпилька, β -поворот, конформация, стереохимический анализ, выравнивание, аминокислотная последовательность

DOI: 10.7868/S0026898416050049

ВВЕДЕНИЕ

β -Шпилька – один из простейших и наиболее часто встречающихся структурных мотивов в белках. Она образована двумя соседними по цепи β -тяжами, которые сложены друг на друга и связаны петлевым участком – перетяжкой, в результате чего образуется антипараллельная β -структура, замкнутая водородными связями. β -Шпильки встречены в структурах глобулярных белков как в изолированном виде, так и в составе других структурных мотивов, таких, например, как abcd- и abCd-единицы, S- и Z-образные β -листы, $\beta\beta$ - и 3β -уголки и т.д. β -Шпильки могут быть правыми и левыми, если смотреть на них с одной выбранной стороны (например, со стороны гидрофобного ядра). В правых шпильках второй по цепи тяж расположен справа относительно первого, а в левых – наоборот. В белках большинство β -шпилек

и β -листов имеют не плоскую, а скрученную структуру, которая напоминает правый пропеллер, если смотреть вдоль β -тяжей [1]. Степень скрученности β -листов в белках отлична, но, в среднем, двугранный угол между соседними β -тяжами близок к -20° [1, 2]. В сильно скрученных β -листах β -тяжи должны быть не только скручены, но и изогнуты (coiled), чтобы образовать большую контактную поверхность без разрушения системы водородных связей [2, 3]. Как показывает анализ, многие β -шпильки в белках имеют такую сильно скрученную и изогнутую структуру, которая может быть представлена в виде своеобразной правой двойной спирали, имеющей вогнутую и выпуклую поверхности. Отличительная особенность таких правых двойных спиралей состоит в том, что они всегда образуются только правыми β -шпильками, если смотреть со сторо-

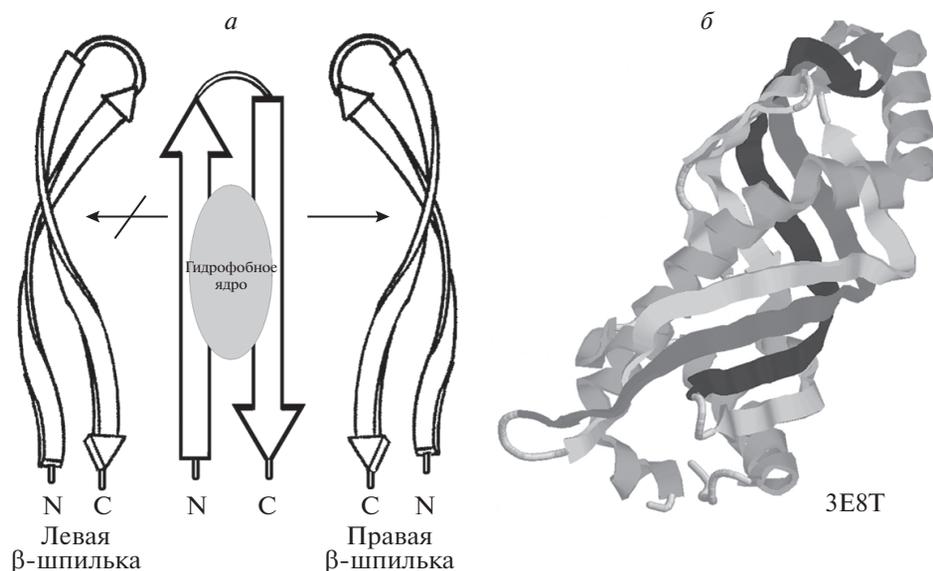


Рис. 1. *а* – Схематическое изображение структуры сильно скрученных и изогнутых β -шпилек (пояснения в тексте). *б* – Ленточная модель белка, содержащего правую сильно скрученную β -шпильку (PDB-код – 3e8t, транспортный белок *Takeout-like protein 1* из *Eriphyas postvittana*). Сильно скрученная β -шпилька выделена темным цветом.

ны вогнутой поверхности [4], т.е. второй тяж по цепи будет всегда располагаться справа относительно первого (рис. 1*а*). Левые β -шпильки такие правые двойные спирали не образуют, и в белках в сильно скрученной форме они не обнаружены [4]. Однако следует отметить, что в белках широко распространены как правые, так и левые β -шпильки, которые могут быть плоскими или слабо скрученными. На рис. 1*б* представлена полученная с помощью программы RasMol [5] структура одного из белков с сильно скрученной и изогнутой β -шпилькой.

Длинные β -шпильки могут сложиться сами на себя, образуя $\beta\beta$ -уголок, и такие шпильки – тоже правые, если смотреть со стороны вогнутой поверхности [4]. Чаще всего сильно скрученные и изогнутые β -шпильки встречаются в β -баррелях, токсинах, ингибиторах, SH3-доменах и Wgr-белках.

В настоящей работе мы провели детальный анализ первичной структуры сильно скрученных и изогнутых β -шпилек. Показано, что на гидрофобной внутренней поверхности шпилек преимущественно находятся глицины, аланины, валины, изолейцины, лейцины, фенилаланины и тирозины, а на внешней, помимо гидрофильных и заряженных аминокислотных остатков, располагаются все имеющиеся в последовательности остатки пролина. Определены наиболее характерные для сильно скрученных β -шпилек типы перетяжек и необходимые для их формирования аминокислотные остатки. Полученные данные будут полезны как для предсказания пространственной структуры белков по первичной структуре, так и для конструирования искусственных белков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Белки для исследования, содержащие скрученные и изогнутые β -шпильки, отобраны из Банка белковых данных (PDB) с помощью разработанной в нашей группе структурной классификации белков PCBOST, которая доступна по адресу <http://strees.protres.ru/> [6], из базы данных SCOP [7] или непосредственно с сервера PDB с помощью ключевых слов. Для анализа отбирали негомологичные белки (белковые домены), проверку на гомологию проводили с помощью программы Blast 2 sequences для попарного выравнивания (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [8]. В соответствии с рекомендациями разработчиков программы негомологичными считали белки, для которых показатель, учитывающий как полную идентичность участков последовательности, так и замены на сходные аминокислоты, при выравнивании аминокислотной последовательности исследуемого домена относительно каждой из последовательностей других анализируемых доменов был менее 50 баллов. β -Шпильки определяли визуально с помощью программы RasMol. Для исследования выбирали только β -шпильки со структурой, близкой к канонической: сильно скрученные и изогнутые, определенные с высоким разрешением, не содержащие протяженных изломов или выпетливаний, с β -тяжами длиной не менее 5 аминокислотных остатков. Длину и конформацию перетяжки между β -тяжами при отборе не учитывали.

Основной объект исследования – сильно скрученные β -шпильки из выделенного нами струк-



Рис. 2. Частоты встречаемости различных аминокислотных остатков во внутренних и внешних позициях сильно скрученных и изогнутых β -шпилек в составе W γ ар-белков; а.о. — аминокислотный остаток.

турного подкласса $\alpha + \beta$ -белков, который назвали “W γ ар-белки” (от английского слова “wrap” — обертка) [9]. Белки и домены, отнесенные к этому подклассу, состоят из сильно скрученного и изогнутого β -листа, на внутренней (вогнутой) поверхности которого упакована одна или две α -спирали. Эти белки объединены только структурным сходством, а не гомологией: среди них есть ингибиторы различных ферментов, антибиотики, регуляторы транскрипции и т.д. Ленточная модель структуры одного из представителей W γ ар-белков с PDB-кодом 3E8T показана на рис. 1б.

В базу данных отобраны 80 сильно скрученных β -шпилек из W γ ар-белков, а также 36 β -шпилек из белков со структурой β -баррелей, 33 — из токсинов, 21 — из ингибиторов, 23 — из SH3- и SH3-подобных доменов и еще 27 скрученных и изогнутых β -шпилек из белков других структурных подклассов. Всего выбрано и изучено 220 сильно скрученных и изогнутых β -шпилек из негомологичных белков. В выборку попали β -шпильки как в составе β -листов, так и одиночные.

Проведен анализ аминокислотного состава β -тяжей на внешней (выпуклой) и внутренней (вогнутой) поверхностях сильно скрученных β -шпилек отдельно для каждого из подклассов белков. Принадлежность каждой из позиций β -тяжа к внешней или внутренней поверхности определяли визуально на скелетной модели молекулы исследуемого белка в программе RasMol. Далее подсчитывали количество каждого из 20 аминокислотных остатков во всех β -тяжах скрученных β -шпилек во внешних и внутренних позициях. Данные представлены в виде обсуждаемых ниже гистограмм.

В случае W γ ар-белков дополнительно проведено выравнивание и анализ аминокислотной последовательности и конформации перетяжек между β -тяжами. Выравнивание выполняли вручную, с

учетом данных о конформации каждого аминокислотного остатка и наличия водородных связей. Для вычисления углов ϕ и ψ использовали программу MolMol [10]. Конформации аминокислотных остатков обозначали в соответствии с номенклатурой, предложенной в 1986 г. [11]. Выравнивали перетяжки или участки перетяжек с одинаковой конформацией. Далее анализировали их аминокислотный состав в каждой из позиций.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гистограмма распределения аминокислотных остатков на внутренней (вогнутой) и внешней (выпуклой) поверхностях β -шпилек из W γ ар-белков представлена на рис. 2.

Видно, что на внутренней поверхности находятся преимущественно глицины, аланины, валины, лейцины, изолейцины, фенилаланины. Различия соотношения гидрофобных и гидрофильных аминокислотных остатков ожидаемы — внутренние позиции по определению обращены в сторону гидрофобного ядра сильно скрученной β -шпильки. Однако обращает на себя внимание резкое преобладание остатков глицина во внутренних позициях. При выравнивании аминокислотных последовательностей скрученных β -шпилек видно, что остатки глицина концентрируются приблизительно в середине β -тяжей, т.е. в области максимального перегиба (см. ниже). Как показал теоретический стереохимический анализ сильно скрученных и изогнутых β -шпилек [4], скручивание неизбежно должно вызывать напряжение, приводящее к специфическому отбору аминокислот. Из-за скручивания в центральной части β -тяжей, как правило, образуются небольшие β -изгибы. Глицин — наиболее конформационно гибкий остаток. Заполнение внутренних позиций остатка-

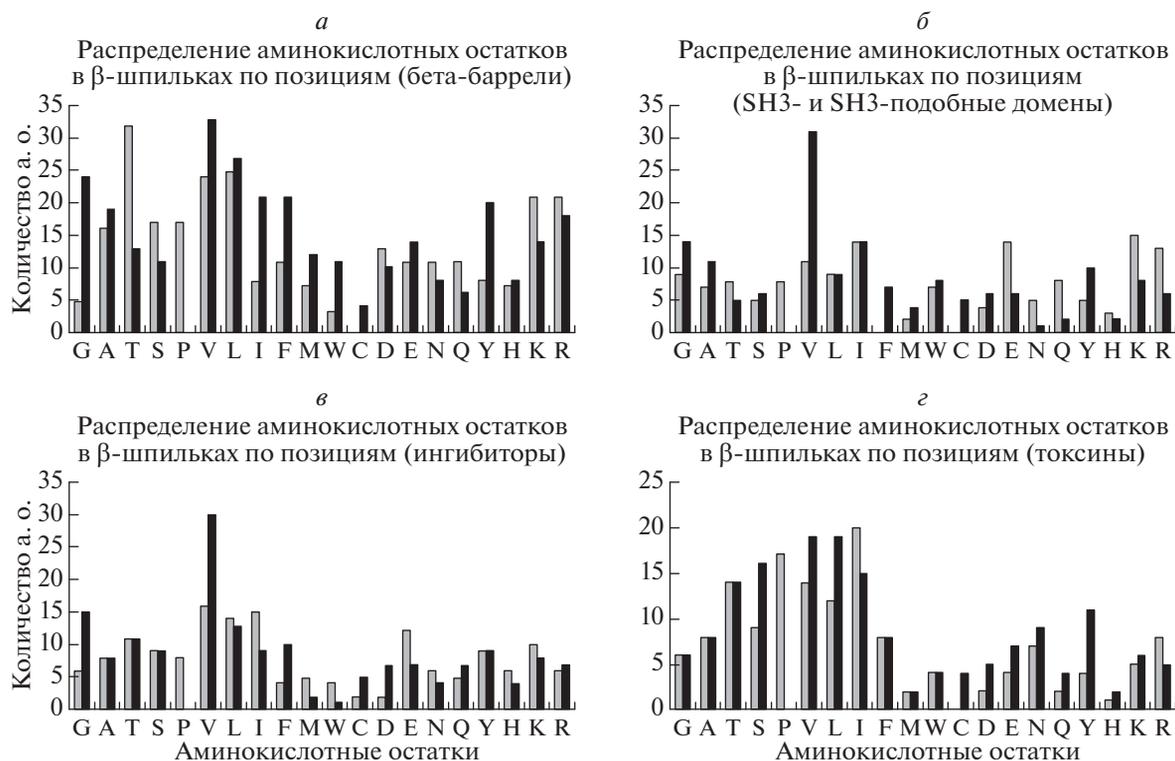


Рис. 3. Частоты встречаемости различных аминокислотных остатков во внутренних и внешних позициях сильно скрученных и изогнутых β-шпилек в составе бета-баррелей (а), SH3-подобных доменов (б), ингибиторов (в) и токсинов (г). На гистограммах серым цветом обозначены внешние позиции β-шпилек, черным – внутренние позиции.

ми глицина либо аланина снимает стереохимическое напряжение.

На внешней стороне преобладают гидрофильные и заряженные аминокислотные остатки. Примечательно, что на внутренней стороне не обнаружено ни одного пролина, при этом на внешней стороне они присутствуют в большом количестве. Наличие пролина на вогнутой поверхности β-шпилек нарушало бы систему водородных связей. Во внешних же позициях пролин формирует излом цепи, облегчающий скручивание. Вероятно, скручивание длинных β-шпилек при подходящей для этого аминокислотной последовательности обеспечивает формирование более плотного гидрофобного ядра.

Аналогичное распределение аминокислотных остатков на вогнутой и выпуклой поверхностях обнаружено для сильно скрученных β-шпилек и в других классах белков (рис. 3а–г). Для белков из группы токсинов не выявлено различия в содержании аминокислотных остатков глицина на внутренних и внешних позициях, но установлен характерный для всех сильно скрученных β-шпилек строгий запрет на содержание пролина во внутренних позициях.

Анализ гистограмм показывает сходство между свойствами сильно скрученных и изогнутых β-шпи-

лек из белков различных классов. Это позволило построить общую диаграмму распределения аминокислотных остатков по поверхностям β-шпилек для всех исследованных белков (рис. 4). Очевидно, что наблюдаемые различия не свойственны отдельному классу белков, они характерны для самой сильно скрученной и изогнутой β-шпилеки. Эти свойства слабо зависят от структурного окружения.

Ранее аналогичный характер отбора аминокислотных остатков для внешних и внутренних позиций описан нами для β-шпилек в составе структурного мотива “3β-уголок”, где центральный из трех β-тяжей изгибается под углом 90° и переходит в ортогональный слой [12]. Такой изгиб также приводит к сильному стереохимическому напряжению, поэтому для его формирования необходимы аминокислотные остатки глицина и аланина во внутренних позициях центрального β-тяжа и полное отсутствие остатков пролина. Отбор аминокислотной последовательности, необходимой для образования 3β-уголка, еще более строг, чем для сильно скрученных β-шпилек в составе других структурных мотивов – содержание глицина во внутренних позициях центрального β-тяжа более чем в 9 раз превышает его содержание во внешних позициях [13].

ды предсказания вторичной структуры белков, которые имели достаточно высокую точность [14, 15]. Впоследствии стало ясно, что образование вторичной структуры зависит и от других факторов, прежде всего от структурного контекста, т.е. от взаимодействий с другими участками цепи белка. Взаимное расположение α -спиралей и/или β -тяжей в пространстве также определено их взаимодействиями с другими элементами вторичной структуры, в том числе и с перетяжками, которые их соединяют [16].

Самыми простыми объектами для изучения всех типов взаимодействий между элементами и взаимосвязи между структурой и аминокислотной последовательностью являются структурные мотивы из двух α -спиралей или двух β -тяжей, связанных перетяжками, такие, например, как α - и β -шпильки, $\alpha\alpha$ -уголки, $\beta\beta$ -дуги и др. Ранее показано, что каждый такой структурный мотив имеет свойственное только ему расположение вдоль цепи ключевых гидрофобных, гидрофильных и глициновых остатков [16, 17]. Особо отметим, что левые и правые α -шпильки, имеющие одинаковую длину и конформацию перетяжки, имеют различное расположение ключевых остатков по ходу цепи [18, 19]. То же самое показано и для левых и правых β -шпилек [17]. В настоящей работе показано существенное различие между правыми сильно скрученными и изогнутыми β -шпильками и правыми же плоскими или слабо скрученными β -шпильками. Как показано ранее, необходимым условием образования обычных β -шпилек (плоских и слабо скрученных) является наличие в их последовательности строго определенного расположения в цепи ключевых гидрофобных, гидрофильных и глициновых остатков (т.е. определенного “паттерна”), свойственного каждому типу β -шпильки [16, 17]. В данной работе мы показали, что для образования сильно скрученных и изогнутых β -шпилек, кроме выполнения этих необходимых условий, требуется наличие дополнительных аминокислотных остатков глицина или других небольших остатков (аланина, серина) на вогнутых поверхностях и пролинов на внешних (выпуклых) поверхностях.

Таким образом, уникальная пространственная структура сильно скрученных и изогнутых β -шпилек (правые двойные спирали, всегда образованные правыми β -шпильками) и описанная выше взаимосвязь между структурой и аминокислотной последовательностью позволяют нам высказать гипотезу о том, что такие β -шпильки могут сворачиваться сами по себе, независимо от остальной части цепи, и могут служить зародышами или готовыми структурными блоками при сворачивании белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (13-04-00150).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chothia C. 1973. Conformation of twisted β -pleated sheets in proteins. *J. Mol. Biol.* **75**, 295–302.
2. Chothia C. 1983. Coiling of β -pleated sheets. *J. Mol. Biol.* **163**, 107–117.
3. Nishikawa K., Scheraga H.A. 1976. Geometrical criteria for formation of coiled-coil structures of polypeptide chains. *Macromolecules.* **9**, 395–407.
4. Efimov A.V. 1991. Structure of coiled β - β -hairpins and β - β -corners. *FEBS Lett.* **284**, 288–292.
5. Sayle R.A., Milner-White E.J. 1995. RASMOL – biomolecular graphics for all. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 374–376.
6. Gordeev A.B., Kargatov A.M., Efimov A.V. 2010. PCBOST: Protein classification based on structural trees. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **397**, 470–471.
7. Murzin A.G., Brenner S.E., Hubbard T. and Chothia C. 1995. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* **247**, 536–540.
8. 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.
9. Boshkova E.A., Gordeev A.B., Efimov A.V. 2014. A novel structural tree for wrap-proteins, a subclass of ($\alpha + \beta$)-proteins. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **32**, 222–225.
10. Koradi R., Billeter M., Wuthrich K. 1996. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* **14**, 51–55.
11. Ефимов А.В. 1986. Стандартные конформации полипептидной цепи в нерегулярных участках белков. *Молекуляр. биология.* **20**, 250–260.
12. Efimov A.V. 1992. A novel super-secondary structure of β -proteins. A triple-strand corner. *FEBS Lett.* **298**, 261–265.
13. Ефимов А.В., Бошкова Е.А. 2014. Два механизма сворачивания белков: теоретический анализ. *Био-орг. химия.* **40**, 665–672.
14. Schiffer M., Edmundson A.B. 1967. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys. J.* **7**, 121–135.
15. Lim V.I. 1974. Algorithms for prediction of α -helical and β -structural regions in globular proteins. *J. Mol. Biol.* **88**, 873–894.
16. Efimov A.V. 1993. Standard structures in proteins. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **60**, 201–230.
17. Efimov A.V. 1993. Patterns of loop regions in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 379–384.
18. Efimov A.V. 1991. Structure of α - α -hairpins with short connections. *Protein Eng.* **4**, 245–250.
19. Бражников Е.В., Ефимов А.В. 2001. Структура альфа-спиральных шпилек с короткими перетяжками в глобулярных белках. *Молекуляр. биология.* **35**, 100–108.

RELATIONSHIP BETWEEN STRUCTURE AND AMINO ACID SEQUENCE OF STRONGLY TWISTED AND COILED β -HAIRPINS IN GLOBULAR PROTEINS

E. A. Boshkova, E. V. Brazhnikov, A. V. Efimov*

Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russia, 142290

**e-mail: efimov@protres.ru*

β -Hairpins are widespread in proteins and occur both as isolated double-stranded antiparallel β -sheets and parts of multiple-stranded β -sheets. A strongly twisted and coiled β -hairpin can be represented as a double-helical structure in which the strands are twisted and coiled in a right-handed mode. In this study, a comparative analysis of amino acid sequences of strongly twisted and coiled β -hairpins found in different structural classes of proteins has been performed. Frequencies of occurrence of amino acid residues in “inside” and “outside” positions of 220 strongly twisted and coiled β -hairpins found in non-homologous proteins have been calculated. As shown, the “inside” positions located on the concave surfaces of such β -hairpins are preferably occupied by hydrophobic residues and the “outside” positions located on the convex surfaces are preferably occupied by hydrophilic ones. A distinctive feature of these β -hairpins is that glycines and alanines have a strong tendency to occupy the “inside” positions (most often in the strongly twisted sites of β -strands), while prolines occupy the “outside” positions. Moreover, prolines are not found in the “inside” positions at all. Another feature is that most of relatively short β -loops (up to 7 residues) connecting the β -strands have at least one residue with the α_L - or ϵ -conformation which should be glycines as a rule. Thus, strongly twisted and coiled β -hairpins are formed if their polypeptide chains have corresponding sequence patterns of the key hydrophobic, hydrophilic, glycine (or small) and proline residues.

Keywords: coiled β -hairpin, β -turn, conformation, stereochemical analysis, alignment, amino acid sequence