

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.150.2

АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ СПРЯТАННЫХ ПОЛЯРНЫХ БОКОВЫХ ЦЕПЕЙ В β -БЕЛКАХ

© 2005 г. Е. В. Бражников, А. В. Ефимов*

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

Поступила в редакцию 03.02.2005 г.

Проведен количественный и качественный анализ полярных боковых цепей, недоступных молекулам воды, а также их взаимодействий в 100 глобулярных β -структурных белках. Показано, что полностью спрятанные полярные боковые цепи широко распространены в β -белках и подавляющее большинство из них участвует во взаимодействиях типа “боковая цепь–боковая цепь” или “боковая цепь–основная цепь”. На основе анализа частот встречаемости различных пар “боковая цепь–партнер” показано, что эти взаимодействия избирательны. Проведено сравнение с аналогичными данными, полученными ранее для α -спиральных белков.

Ключевые слова: глобулярные белки, β -структура, доступная поверхность, водородная связь, специфичность взаимодействий.

ANALYSIS OF INTERACTIONS OF BURIED POLAR SIDE CHAINS IN β -PROTEINS, 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). It was shown in qualitative and quantitative analyses of polar side chains inaccessible for water molecules as well as their interactions in 100 globular β -structural proteins that completely buried polar side chains are widespread in β -proteins, their vast majority being involved in “side chain–side chain” or “side chain–main chain” interactions. The analysis of the occurrence of different “side chain–partner” pairs permitted us to demonstrate that such interactions are selective. The results were compared with similar data obtained previously for α -helical proteins.

Key words: globular proteins, β -structure, accessible surface, hydrogen bond, selectivity of interactions.

Отличительной чертой строения глобулярных белков является наличие в их молекулах гидрофобных ядер, образованных, в основном, гидрофобными боковыми цепями, и полярных оболочек из гидрофильных боковых цепей [1]. Гидрофильные боковые цепи могут находиться в гидрофобных ядрах, если они имеют партнеров для образования водородных, солевых или координационных связей [2, 3]. И хотя присутствие полностью спрятанных (недоступных молекулам воды) полярных боковых цепей в ядрах белков замечено давно [2–5], их структурная роль стала проясняться сравнительно недавно, после того как были разработаны модельные системы на основе так называемых “лейциновых застежек” или α -белков (от английского coiled coils – скрученные спирали). Так, показано, что степень олигомеризации α -спиралей и выбор параллельной или антипараллельной ориентации α -спиралей в структурах этого класса белков в значительной степени зависят от взаимодействий между спрятанными полярными остатками [6–8], т.е. эти вза-

имодействия придают специфичность упаковкам α -спиралей.

Проведенный в работах [9, 10] сравнительный анализ показал, что в основных чертах межспиральные полярные взаимодействия в α -белках одинаковы, что свидетельствует в пользу одинаковой структурной роли этих взаимодействий в обоих классах белков. Очень важно, что межспиральные полярные взаимодействия избирательны, т.е. в этих белках, например, доноры боковых цепей взаимодействуют не с любыми акцепторами, а преимущественно образуют определенные пары [9, 10]. Можно предположить, что такая избирательность свойственна только межспиральным взаимодействиям и не будет наблюдаться в β -структурных белках. Проверка этого предположения была одной из основных задач настоящей работы. В результате мы показали, что взаимодействия между спрятанными полярными боковыми цепями в β -белках также избирательны и, по-видимому, играют очень важную роль при сворачивании белков в уникальные структуры.

* Эл. почта: efimov@protres.ru

Таблица 1. Частоты встречаемости спрятанных полярных остатков в 100 β-белках

№	Код белка	E	Q	D	N	K	S	T	R	H	W	Y	Всего на белок
1	1ag6				1							1	2
2	1aol	1			1			2			2	1	7
3	1aq6						3						3
4	1at3			1	2		2					1	6
5	1aun			1	2		4	1	1		2	2	13
6	1az3					1		1				1	3
7	1azc				1		1	1		2	1	3	9
8	1b56		2				1	2	1		1	1	8
9	1bd9			1				3	1	1	2	5	13
10	1beb		1				2	1					4
11	1ca9						2						2
12	1cyn		1				1						2
13	1czs	1	2		1		1	2				1	8
14	1d2s		1	2			2	2		1		1	9
15	1d3b	1						1				1	3
16	1d7k			2	1		2	1			1	5	12
17	1dev	2		1	1		1					1	6
18	1dg6		1				2	2				2	7
19	1dlc	1		1	2		4	6		2	2	3	21
20	1dmh		1		1		1	2	2	2	1	2	12
21	1dnl				1			2	1			1	5
22	1du5			1	1		3	1	1		1	2	10
23	1e2w		1		1				1				3
24	1e44			2	1		1	1				2	7
25	1e5p							1				1	2
26	1edy			1			1	1				2	5
27	1efi	1	1				2	1			1	1	7
28	1ejf			2	1	1	2						6
29	1elp				1		4				2	3	10
30	1epa	1					1	2			1	1	6
31	1es6		1				1	2		1		1	6
32	1eut		3	1	5		9	19	2	3	1	7	50
33	1exm			1	3		3	3		1		2	13
34	1f35										1		1
35	1f3u						1	2		1			4
36	1f41	1		1				1		1		2	6
37	1g13						2	1			1		4
38	1g31						2	2		1			5
39	1g8f		1	1			1	1		2		2	8
40	1gny	1	2					1					4
41	1goh	2	2	2	4		13	14	1	3	6	5	52
42	1gtr	1	2	1	2		1	3	4	1		5	20
43	1hbq		1	1	1		3	1			1	1	9
44	1hd8			1	1	1	3	2					8
45	1hug	1			1			1		4	2	2	11
46	1hxr									2	1		3
47	1i4u		1	2	1		6	3			1	3	17
48	1i81						2					1	3
49	1iaz	1	1	1	3		2	1			2	3	14
50	1ikp	2	1		2	1	7	4	1	2	2	6	28

Таблица 1. Окончание

№	Код белка	E	Q	D	N	K	S	T	R	H	W	Y	Всего на белок
51	1j71		2	5			3	4			1	4	19
52	1j8s		1		3		3	2		1	1	1	12
53	1jac			1			4	1				1	7
54	1jhj		1		1		1	2		1	1	1	8
55	1jlx		1	1	3		4	3		3	2	2	19
56	1jsg			1			1			1	3	2	8
57	1ju3	1	2	6	4		5	3	3		2	4	30
58	1k5j	1					1	2		1			5
59	1k6w	1	2	1	2		2	2	1	4			15
60	1kfu	3	1	1			3	2	2		1	3	16
61	1knb			1			1	2			1	1	6
62	1lox		1			1	2	1			1		6
63	1neu										1		1
64	1osp		2				3	1			2	3	11
65	1p35		1	1	2		3	1	2			4	14
66	1pdk	1	1		2	1	1	2	1			3	12
67	1pgs	1			3		5	3	2	2		6	22
68	1poo	1	2	2	1	1	5	3			1	7	23
69	1qba	2	2	3	2		3	3	2	4	2	6	29
70	1qex						2	1		1	1		5
71	1qfv	2		2			2	1					7
72	1qhd			1				1			1		3
73	1qou			1				2		1			4
74	1qrw	1	1				7	2		1	2	1	15
75	1qtf						1	5		1		2	9
76	1qvc	1						2		1		1	5
77	1rie			1			1		3			3	8
78	1rl2							1				1	2
79	1sft	1				1	1	4	1	2		1	11
80	1sgp		1		1		4	4	1		1	1	13
81	1sgt	1	1				2	2				1	7
82	1slu							1					1
83	1smp	1		2	4		1	2			1	3	14
84	1spp	1						2			4	2	9
85	1stm			1	1		1	1				1	5
86	1stn	1		2								1	4
87	1tl2							1				3	4
88	1vie							1				1	2
89	1whi												0
90	1who				1			1			1		3
91	lycs						2	2				3	7
92	lygs			1			1						2
93	lytf				2			4					6
94	2eng		1				2	2					5
95	2viu				1	1	5	2		1	1	2	13
96	3cms		2	3			4	2			3	3	17
97	3ezm						1						1
98	3sil	1	1	2	3		11	6	3	2	3	1	33
99	4aah		5	2	4	4	9	10	1	3	5	11	54
100	4tsv						2			1			3
	Итого	38	57	68	82	13	208	196	38	61	77	174	1012

Таблица 2. Частоты встречаемости различных спрятанных пар донор–акцептор, участвующих в образовании оптимальных водородных связей в β-белках

№		E	Q OE1	Q NE2	D	N OD1	N ND2	K NZ	S OG	T OG1	R NH1	R NE	H NE2	H ND1	W NE1	Y OH	O	N	Не образуют H-связей
1	OE1 E OE2	-	-	2	-	-	1	3	3	-	12	10	5	2	5	8	-	18	2
2	OE1 Q NE2	-	-	3	1	-	3	2	5	3	10	3	-	-	1	1	-	14	4
		6	3	-	3	4	-	-	6	6	-	-	-	-	-	2	34	-	
3	OD1 D OD2	2	1	1	-	-	8	8	13	8	24	10	2	3	2	10	-	48	4
4	OD1 N ND2	-	-	8	-	-	5	4	7	3	3	3	2	1	1	3	-	33	2
		4	4	-	8	1	-	-	6	3	-	1	-	-	-	8	47	-	
5	K NZ	5	1	-	4	3	-	-	2	2	-	-	1	-	-	1	10	-	-
6	S OG	13	4	8	18	10	5	6	8	15	5	4	7	5	1	9	82	80	19
7	T OG1	10	5	10	10	4	4	6	15	8	6	2	4	3	5	9	79	68	16
8	NH1,2 R NE	6	5	-	10	2	-	-	2	4	-	-	-	2	-	2	26	-	2
		3	2	1	7	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	2	10	-	
9	NE2 H ND1	5	1	-	5	1	2	1	3	5	1	-	-	-	-	5	11	2	6
		2	1	-	6	1	1	-	4	5	1	1	1	2	1	5	8	7	
10	W NE1	1	2	-	3	-	-	-	3	7	-	-	1	1	-	3	32	-	20
11	Y OH	18	4	7	16	5	9	7	9	13	15	7	3	6	1	4	45	20	27

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

100 глобулярных β-белков с разрешением до 2.5 Å отобрано для анализа. Выбор белков проводили из базы данных SCOP [11] (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>). В исследованный набор входили белки, имеющие все известные типы укладок β-структуры. PDB-коды отобранных белков были следующие:

1ag6, 1aol, 1aq6, 1at3, 1aun, 1az3, 1azc, 1b56, 1bd9, 1beb, 1ca9, 1cyn, 1czs, 1d2s, 1d3b, 1d7k, 1dev, 1dg6, 1dlc, 1dmh, 1dnl, 1du5, 1e2w, 1e44, 1e5p, 1edy, 1efi, 1ejf, 1elp, 1epa, 1es6, 1eut, 1exm, 1f35, 1f3u, 1f41, 1g13, 1g31, 1g8f, 1gny, 1goh, 1gtr, 1hbq, 1hd8, 1hug, 1hxr, 1i4u, 1i81, 1iaz, 1ikp, 1j71, 1j8s, 1jac, 1jhj, 1jlx, 1jsg, 1ju3, 1k5j, 1k6w, 1kfu, 1knb, 1lox, 1neu, 1osp, 1p35, 1pdk, 1pgs, 1poo, 1qba, 1qex, 1qfv, 1qhd, 1qou, 1qrw, 1qtf, 1qvc, 1rie, 1rl2, 1sft, 1sgp, 1sgt, 1slu, 1smp, 1spp, 1stm, 1stn, 1tl2, 1vie, 1whi, 1who, 1ycs, 1ygs, 1ytf, 2eng, 2viu, 3cms, 3ezm, 3sil, 4aah, 4tsv.

Полярными считали боковые цепи аминокислотных остатков Glu, Gln, Asp, Asn, Lys, Ser, Thr, Arg, His, Trp, Tyr. Для определения водородных связей и расчета доступной поверхности атомов, участвующих в водородных связях, использовали программу WHAT_IF, имеющуюся в свободном

доступе на сервере (<http://www.cmbi.kun.nl:1100/WIWWWI/>). Боковая цепь считалась полностью спрятанной, если ее доступность была меньше 2 Å². Рассматривались только оптимальные водородные связи, количество которых несколько меньше всех возможных водородных связей. Критерии образования оптимальных и возможных водородных связей, а также их геометрические параметры, приведены в работе [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты количественного анализа спрятанных полярных боковых цепей для 100 отобранных β-белков представлены в табл. 1. Всего в этих белках содержится 8136 аминокислотных остатков, входящих в состав β-структуры. Из них 3790 – полярные остатки, и, как видно из таблицы, 1012 полярных остатков полностью недоступны молекулам воды. Чаще всего недоступными молекулам воды оказываются боковые цепи серинов (208 боковых цепей), треонинов (196 боковых цепей) и тирозинов (174 боковые цепи). Их число в 2–3 раза превышает частоты встречаемости других спрятанных полярных боковых цепей. Количество спрятанных полярных боковых

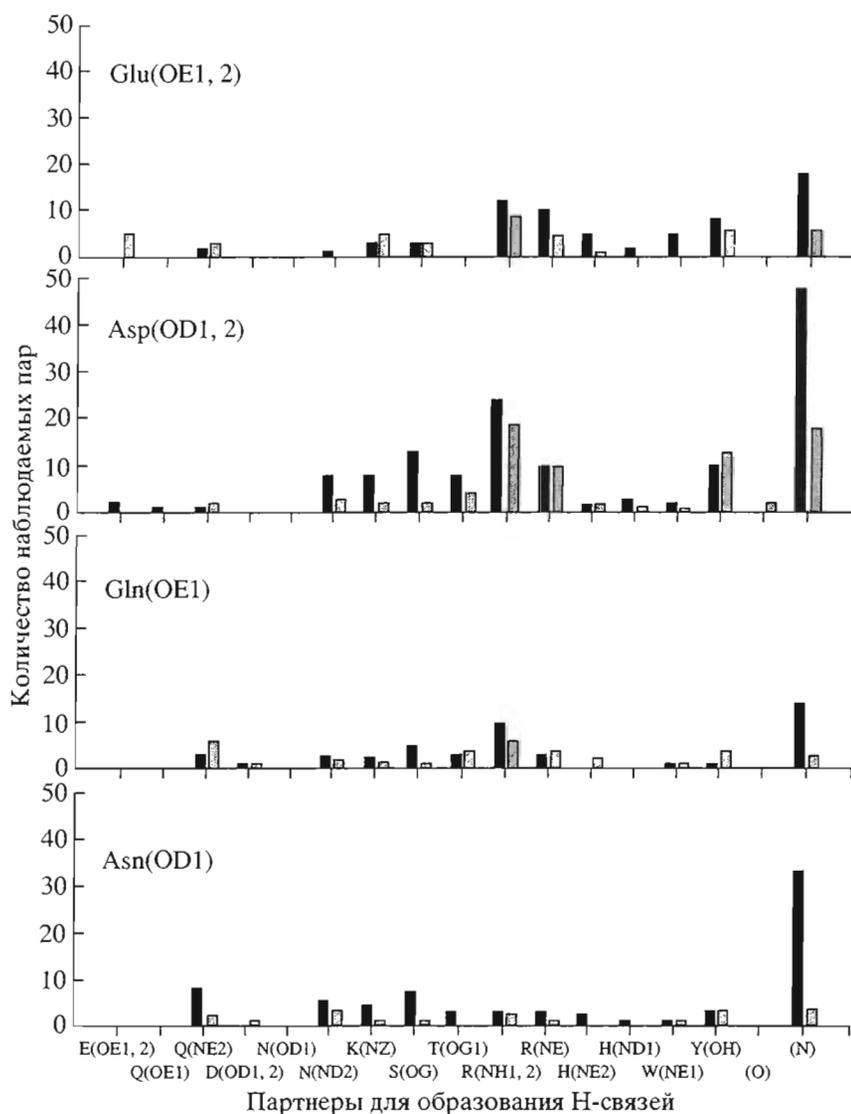


Рис. 1. Частоты встречаемости пар “спрятанный акцептор–партнер”. По оси Y отложено количество соответствующих спрятанных акцепторов, а по оси X – их партнеры по образованию водородных связей. Черные и серые прямоугольники – β -структурные и α -спиральные белки, соответственно.

цепей сильно изменяется от белка к белку, однако, в среднем, в молекулах β -структурных белков число спрятанных полярных остатков (1012 остатков на 100 белков) почти в 2 раза больше, чем в α -спиральных белках (557 остатков на 80 белков [9]). Таким образом, спрятанные полярные боковые цепи довольно широко распространены в глобулярных белках, и их наличие в молекулах белков является скорее правилом, чем исключением. Как показал анализ, большинство спрятанных полярных боковых цепей имеет партнеров для образования водородных или солевых связей.

При отсутствии таких партнеров погружение полярной боковой цепи в гидрофобное окружение приводит к разрыву водородных связей с водой без образования новых связей. Следовательно, гидрофильный потенциал полярной боковой

цепи оказывается “нескомпенсированным”, что существенно понижает стабильность структуры. Такая “потеря” партнеров может происходить, например, при неправильном сворачивании белка, что должно приводить к дестабилизации неправильно свернутых структур и к их распаду. Это означает, что спрятанные полярные боковые цепи могут играть очень важную роль при сворачивании белка, вынуждая белок “искать” правильное взаимное расположение элементов структуры, при котором партнеры будут рядом, осуществляя таким образом своеобразную коррекцию сворачивания. С другой стороны, наличие спрятанных полярных боковых цепей без партнеров в нативных молекулах белков может иметь функциональное значение, поскольку таким образом может быть изменена стабильность белка и подвиж-

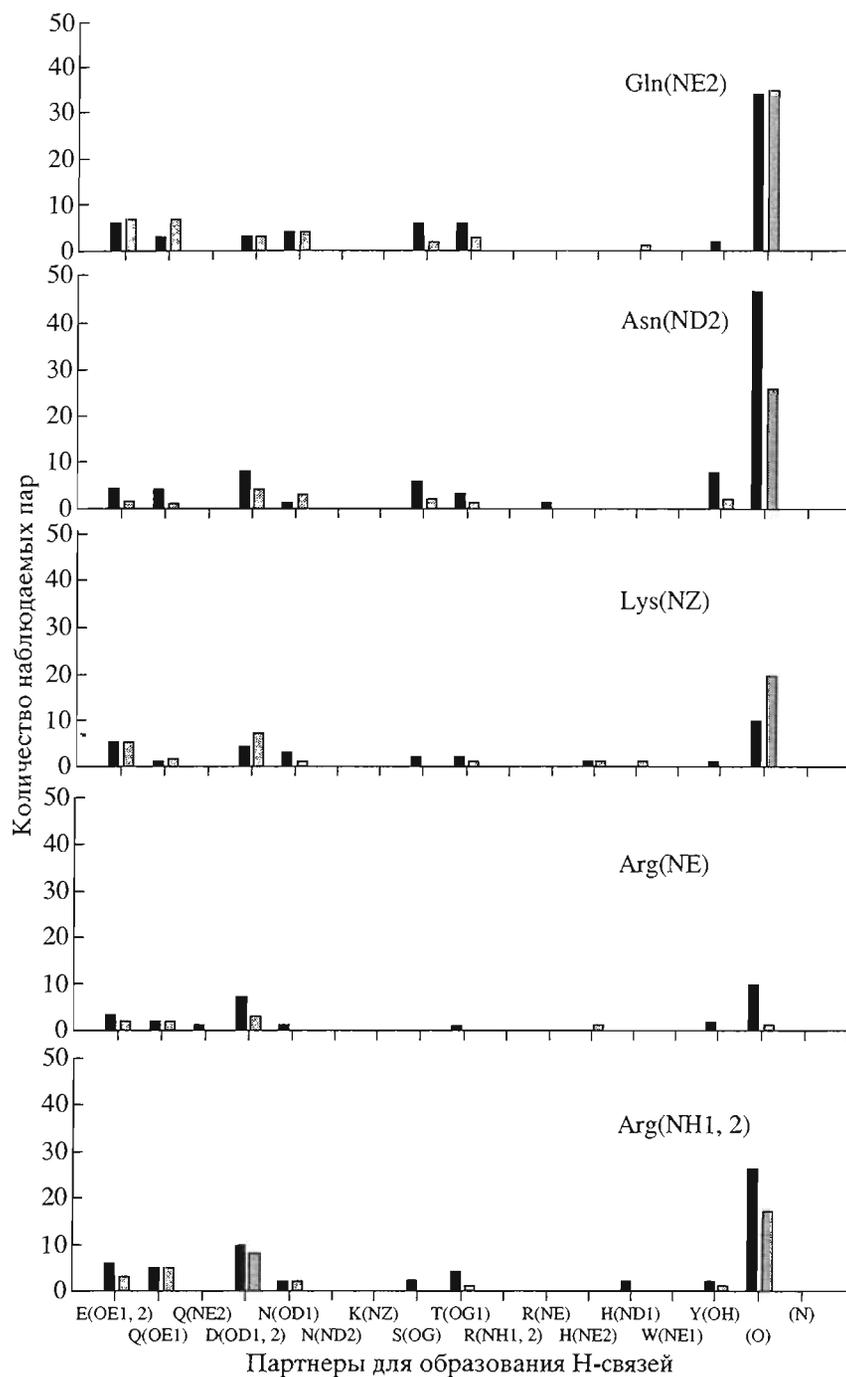


Рис. 2. Частоты встречаемости пар “спрятанный донор–партнер”. По оси Y отложено количество соответствующих спрятанных доноров, а по оси X – их партнеры по образованию водородных связей. Черные и серые прямоугольники – β-структурные и α-спиральные белки, соответственно.

ность одних частей молекулы относительно других.

Для выявления возможной избирательности взаимодействий спрятанных полярных боковых цепей мы изучили частоты встречаемости пар “спрятанная боковая цепь–партнер”, которые образуют между собой водородные связи. Мы исходили из того, что высокая частота встречаемости

одних спрятанных пар “боковая цепь–партнер” по сравнению с количеством других пар, образованных этой же боковой цепью, указывает на избирательность взаимодействия данной боковой цепи. Суммарные данные о том, с какими партнерами и как часто образуют водородные связи различные доноры и акцепторы спрятанных боковых цепей, представлены в табл. 2. В строках таб-

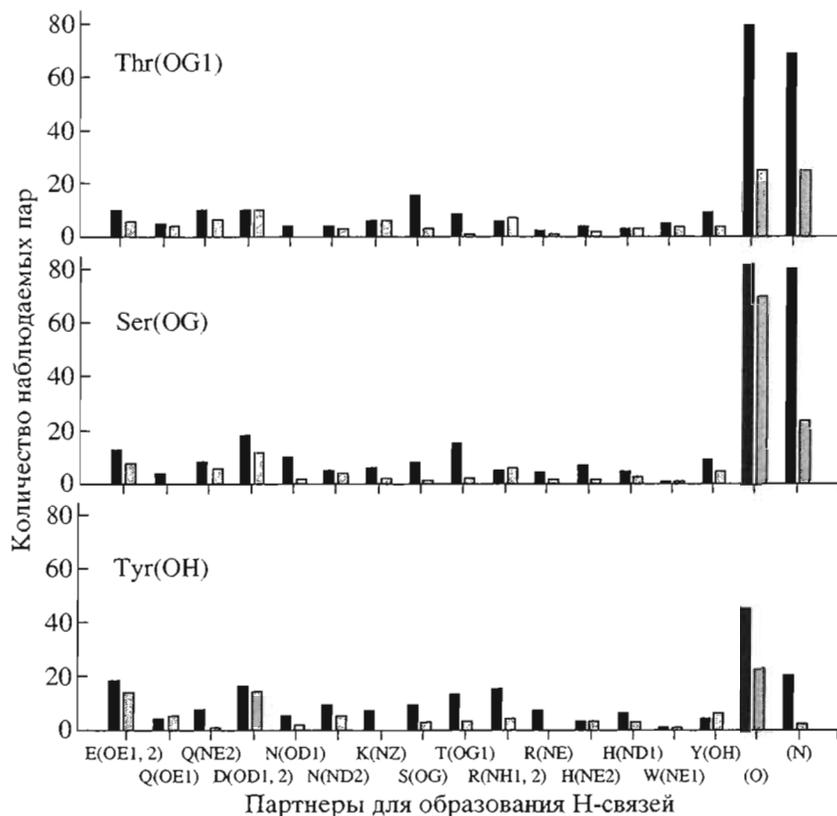


Рис. 3. Частоты встречаемости пар “спрятанный донор/акцептор–партнер” для спрятанных боковых цепей треонина, серина и тирозина. По оси Y отложено количество спрятанных атомов кислорода, а по оси X – их партнеры по образованию водородных связей. Черные и серые прямоугольники – β -структурные и α -спиральные белки, соответственно.

лицы указаны доноры и акцепторы спрятанных боковых цепей, а в столбцах – партнеры для образования водородных связей, которые могут быть как полностью, так и частично спрятанными. Для наглядности эти же данные представлены в виде гистограмм на рис. 1–4. На гистограммах показаны также частоты встречаемости аналогичных пар в α -спиральных белках для сравнения.

Как видно, для всех спрятанных доноров и акцепторов преобладающими являются взаимодействия типа “боковая цепь–основная цепь”, и особенно большой вклад в эти взаимодействия вносят боковые цепи треонинов, серинов и тирозинов. Высокая частота встречаемости таких пар как в α -спиральных, так и в β -структурных белках, несомненно, указывает на важный вклад этих взаимодействий в стабильность белков. Однако взаимодействия этого типа едва ли можно отнести к избирательным (или специфическим), и высокая частота встречаемости пар “боковая цепь–основная цепь” объясняется, по-видимому, просто большим избытком в белках доноров и акцепторов основной цепи.

В этой связи нас интересовали, в основном, пары “боковая цепь–боковая цепь”. Так же как в α -белках, в β -белках наблюдаются относительно

высокие частоты встречаемости пар Asp-Arg, Asp-Lys, Glu-Arg, Glu-Lys, His-Glu и His-Asp. По-видимому, это связано с тем, что боковые цепи этих остатков находятся в заряженной форме и образуют ионные пары с большим выигрышем энергии, чем водородные связи между незаряженными донорами и акцепторами. Среди других выделяется предпочтительность Tyr, Ser и Thr образовывать водородные связи с Asp и Glu, а также между собой. Отметим также, что одноименно заряженные боковые цепи не образуют между собой водородных связей, что и следовало ожидать из общих физико-химических соображений. Небольшое количество наблюдаемых водородных связей в парах Asp-Glu и Glu-Glu объясняется тем, что одна из боковых цепей (или обе) может находиться в незаряженной форме и выступать в качестве донора.

Сравнение частот встречаемости и избирательности образования различных пар в α -спиральных и β -структурных белках, представленное на рис. 1–4, показывает, что в основных чертах поведение спрятанных полярных остатков в обоих классах белков одинаково. Это указывает на их одинаковую структурную роль в этих белках.

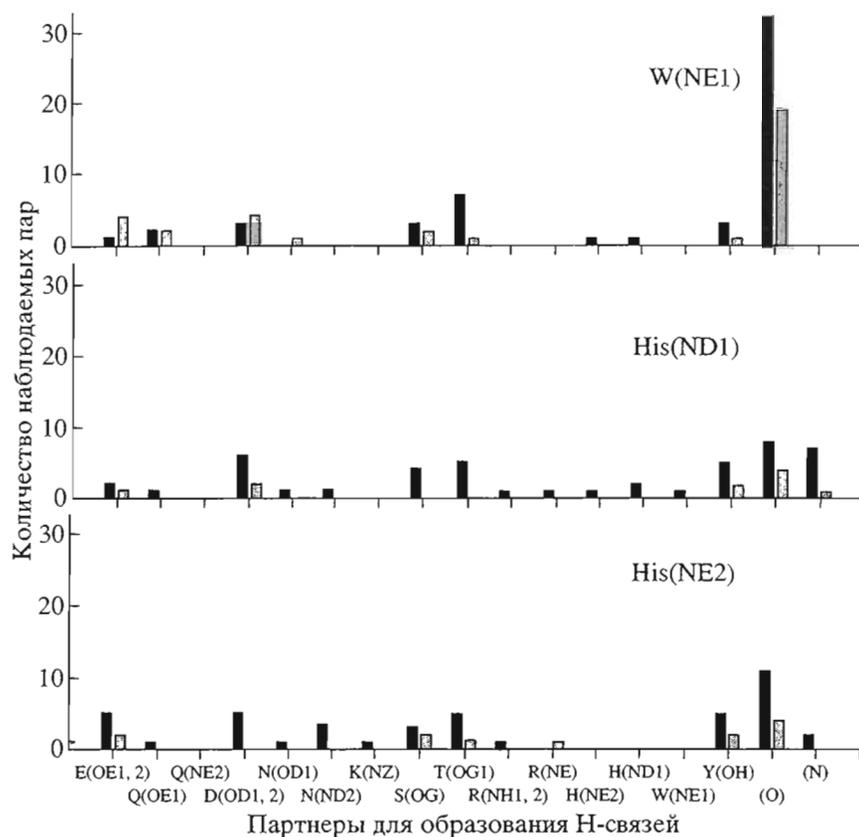


Рис. 4. Частоты встречаемости скрытых водородных связей, образованных боковыми цепями триптофанов и гистидинов. По оси Y отложено количество соответствующих скрытых атомов, а по оси X – их партнеры по образованию водородных связей. Черные и серые прямоугольники – β -структурные и α -спиральные белки, соответственно.

С одной стороны, взаимодействия скрытых полярных остатков вносят существенный вклад в стабильность белка. Последние исследования [13] показывают, что скрытые водородные связи энергетически выгоднее, чем связи, доступные молекулам воды. Это объясняется двумя основными причинами. Во-первых, диэлектрическая проницаемость внутри белка ниже, чем на поверхности или в водной среде, что приводит к усилению электростатических взаимодействий между скрытыми полярными группами, и, во-вторых, молекулы воды не конкурируют за образование водородных связей со скрытыми донорами и акцепторами белка.

С другой стороны, скрытые полярные группы могут уменьшать стабильность белка, если у них нет партнеров для образования водородных, координационных или солевых связей. Во-первых, это может иметь функциональное значение, например приводить к увеличению подвижности одних частей молекулы относительно других. Во-вторых, как отмечалось выше, погружение полярных групп в гидрофобное окружение без партнеров при неправильном сворачивании белка может приводить к резкому уменьшению стабильности и разворачиванию неправильно свернутых

структур и тем самым обеспечивать “коррекцию” сворачивания белков. Наконец, скрытые полярные остатки могут определять специфичность упаковок элементов вторичной структуры [6–8, 10]. Все это вместе показывает важнейшую роль, которую скрытые полярные остатки играют при формировании и поддержании нативной структуры белков и подчеркивает необходимость дальнейшего ее изучения.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (04-04-49343a) и гранта “Научные школы” (1968.2003.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Perutz M.F., Kendrew J.C., Watson H.C. 1965. Structure and function of haemoglobin. II. Some relations between polypeptide chain configuration and amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **13**, 669–678.
2. Lee B., Richards F.M. 1971. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J. Mol. Biol.* **55**, 379–400.
3. Chothia C. 1976. The nature of the accessible and buried surfaces in proteins. *J. Mol. Biol.* **105**, 1–14.
4. Barlow D.J., Thornton J.M. 1983. Ion-pairs in proteins. *J. Mol. Biol.* **168**, 867–885.

5. Rashin A.A., Honig B. 1984. On the environment of ionizable groups in globular proteins. *J. Mol. Biol.* **173**, 515–521.
6. Gonzales L., Jr., Woolfson D.N., Alber T. 1996. Buried polar residues and structural specificity in the GCN4 leucine zipper. *Nature Struct. Biol.* **3**, 1011–1018.
7. Oakley M.G., Kim P.S. 1998. A buried polar interaction can direct the relative orientation of helices in a coiled coil. *Biochemistry.* **37**, 12603–12610.
8. Lumb K.J., Kim P.S. 1995. A buried polar interaction imparts structural uniqueness in a designed heterodimeric coiled coil. *Biochemistry.* **34**, 8642–8648.
9. Кондратова М.С., Ефимов А.В. 2002. Систематический анализ спрятанных полярных боковых цепей и их взаимодействий в α -спиральных белках. *Молекуляр. биология.* **36**, 144–151.
10. Ефимов А.В., Кондратова М.С. 2003. Сравнительный анализ межспиральных полярных взаимодействий в различных упаковках α -спиралей в белках. *Молекуляр. биология.* **37**, 515–521.
11. Murzin A.G., Brenner S.E., Hubbard T., Chothia C. 1995. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* **247**, 536–540.
12. Hooft R.W.W., Sander C., Vriend G. 1996. Positioning hydrogen atoms by optimizing hydrogen-bond networks in protein structures. *Proteins.* **26**, 363–376.
13. Efimov A.V., Brazhnikov E.V. 2003. Relationship between intramolecular hydrogen bonding and solvent accessibility of side-chain donors and acceptors in proteins. *FEBS Lett.* **554**, 389–393.