_____ СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ____ Соединений

УДК 577.322.54

ИЗУЧЕНИЕ КОНФОРМАЦИОННОЙ ПОДВИЖНОСТИ GroEL МЕТОДАМИ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

© 2021 г. И. С. Панина¹, А. А. Мамчур², И. А. Ярошевич², Д. В. Зленко², Е. Б. Пичкур³, С. С. Кудрявцева⁴, В. И. Муронец⁴, О. С. Соколова², Т. Б. Станишнева-Коновалова^{2,*}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия

³ Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт", Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

*E-mail: stanishneva-konovalova@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 06.08.2020 г. После доработки 06.08.2020 г. Принята к публикации 25.03.2021 г.

Бактериальный шаперонин GroEL представляет собой сложный белковый олигомер кольцевой структуры, способствующий сворачиванию других белков путем их инкапсуляции в полости. Существует крайне мало структурной информации о неупорядоченном С-концевом фрагменте субъединиц GroEL, который участвует в процессе сворачивания субстратного белка. Представлена 3D-реконструкция апо-формы GroEL, полученная с помощью криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) с разрешением 3.02 Å и дополненная расчетами методом молекулярной динамики (МД). Результаты крио-ЭМ и МД хорошо согласуются и демонстрируют различную подвижность доменов субъединиц белка. Данные МД предсказывают динамику и сеть внутримолекулярных контактов С-концевых участков белка. Эти результаты имеют большое значение для последующего изучения механизма сворачивания белков в полости GroEL.

DOI: 10.31857/S0023476121050167

введение

Шапероны — белки, отвечающие за сворачивание других макромолекул и обеспечивающие образование их нативной трехмерной структуры. Шапероны также называют белками теплового шока (англ. Heat Shock Proteins, HSP), поскольку их активность сильно возрастает при повышении температуры [1]. В группу шаперонов входят белки, имеющие схожие функции, но различающиеся по структуре и специфичности к субстрату [2]. Одним из семейств шаперонов являются шаперонины (HSP60). Обычно они представляют собой структуру из двух колец, каждое из которых содержит несколько субъединиц, различающихся по строению и расположению у разных организмов [3].

Выделяют две группы шаперонинов. К первой относятся шаперонины бактерий, а также шаперонины хлоропластов и митохондрий. Комплексы этой группы образуют симметричные кольца, каждое из которых состоит из семи одинаковых субъединиц. Шаперонины первой группы в своем функциональном цикле взаимодействуют с кошаперонином, образующим "крышку" над полостью кольца и инкапсулирующим белок-субстрат. Вторая группа шаперонинов объединяет белки, представленные в цитозоле эукариот и архей. Шаперонины второй группы тоже состоят из двух колец, однако каждое из них включает в себя восемь или девять субъединиц. При этом субъединицы внутри одного кольца могут различаться по структуре [4]. Кроме того, некоторые бактериофаги имеют в геноме последовательности, кодирующие ортологи GroEL [5, 6]. Примечательно, что шаперонины бактериофагов могут значительно отличаться от бактериальных: шаперонин бактериофага OBP Pseudomonas fluorescens представляет собой асимметричную однокольцевую структуру из семи субъединиц [7].

Наиболее изученным шаперонином является прокариотический комплекс GroEL/GroES, который в нормальных условиях широко представлен в клетках *E. coli*. Он взаимодействует с ненативными конформациями различных белков, предотвращая их неправильное сворачивание и агрегацию, и обладает слабой АТФ-азной активностью [8]. По своей структуре бактериальный шаперонин GroEL представляет собой сложный олигомерный белковый комплекс, состоящий из 14 идентичных субъединиц с молекулярной массой (**MM**) 57 кДа каждая, объединенных в два кольца по семь субъединиц. Для осуществления своей функции ему необходимо взаимодействовать с GroES [9], состоящим из семи идентичных субъединиц с MM 10 кДа каждая, объединенных в куполообразную кольцевую структуру. Каждая субъединица гептамерного кольца GroEL состоит из трех доменов: апикального, промежуточного и экваториального. Апикальный домен взаимодействует с белками-субстратами и GroES, а экваториальный связывает АТФ [10].

Между аминокислотными остатками GroEL формируются контакты, часть из которых меняется в ходе функционального цикла. В апо-форме (т.е. форме без нуклеотидов и белка-субстрата) связь колец друг с другом обеспечивают солевые мостики между остатками экваториальных доменов: Lys105-Ala109 и Glu461-Arg452 [11-15]. Также солевыми мостиками связаны соседние субъединицы внутри одного кольца (Arg197-Glu386). Считается, что этот контакт, стабилизирующий структуру олигомера в апо-форме, разрушается при связывании АТФ, что запускает конформационные перестройки белкового комплекса [16, 17]. Кроме того, существует несколько внутрисубъединичных солевых мостиков: Asp83-Lys327, Glu209-Arg58 и Glu409-Arg501. Первые два мостика наиболее характерны для шаперонинов в связанном с нуклеотидом состоянии, но в отсутствие кошаперонина. Такие структуры более открыты, чем апо-форма (апикальный домен сильнее удален от экваториального), но конформационные перестройки еще не завершены. Контакт между аминокислотами Glu409 и Arg501 является очень стабильным и не разрушается даже при связывании АТФ и переходе в наиболее открытую конформацию субъединицы [16, 17].

Выяснить структуру и механизм работы комплекса GroEL/GroES во многом помогли методы рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ), с помощью которых было получено более 150 структур комплекса (по данным базы Protein Data Bank), в том числе на разных стадиях функционального цикла. Однако у структурных методов есть ряд ограничений, в частности они не могут расшифровать подвижные участки молекул. У GroEL 23 аминокислоты С-конца каждой субъединицы образуют подвижный хвост, который выходит из экваториального домена в полость кольца [18]. Этот участок отсутствует на реконструкциях комплекса, но важен для его функционирования. Последние 13 аминокислот С-конца представляют собой четыре повтора последовательности Gly-Gly-Met и одну аминокислоту метионин (гидрофобная последовательность [GGM]₄M), а предыдущие аминокислоты содержат отрицательные заряды. Гидрофобная последовательность является консервативным участком для всех гомологов GroEL [19]. Удаление этой последовательности не вызывает гибели бактерий. однако снижает их устойчивость к тепловому шоку [20]. Замена последовательности на [ААА]₄А приводила к тому, что скорость сворачивания субстрата была ниже, чем для дикого типа, но больше, чем для мутанта с полностью удаленными С-концами [21]. Исследование гидрофильной части С-концевого фрагмента (аминокислоты 526-531), в котором гидрофильный участок заменялся на нейтральный или гидрофобный, продемонстрировало, что мутанты значительно медленнее восстанавливали нативную структуру субстратного белка роданазы [22]. В других работах было показано, что при удалении С-концов значительно снижалась скорость сворачивания субстратов Рубиско [23] и GFP [24]. Хотя структурные методы не дали результатов об атомарной структуре С-концевых участков, они позволили обнаружить некоторые закономерности в их динамике. В [25] методом крио-ЭМ показано, что С-концевые фрагменты цис- и трансколец отклоняются друг от друга и взаимодействуют с субстратными красителями, которые использовались в данном эксперименте. В том же исследовании при рассмотрении комплекса Gro-EL-Рубиско отмечено, что субстратный белок контактирует с апикальными доменами и С-коннами

Вычислительные методы, включая метод молекулярной динамики (МД), могут выступать в качестве дополнения к структурным, моделируя подвижные участки. С помощью МД ранее проводилось изучение С-концевых фрагментов GroEL и было показано, как меняется положение Сконцов в ходе функционального цикла и как на него влияет присутствие нуклеотидов [26]. В этом исследовании использовались АТФ- и АДФ-связанные кристаллические структуры GroEL, а положения всех остатков, кроме С-концевых, были зафиксированы. В настоящей работе использована полученная авторами структура апо-формы GroEL дикого типа по данным крио-ЭМ, построена ее атомарная модель с С-концевыми участками и проведен расчет МЛ-системы без дополнительных ограничений. Результаты МД указывают на различия в подвижности доменов субъединиц, что согласуется с вариациями локального разрешения структуры из крио-ЭМ, а также описывают динамику С-концевых участков в апо-форме.

МЕТОДЫ

Наработка и очистка GroEL. Продукцию шаперонина GroEL осуществляли, используя замороженную бактериальную культуру W3110 E. coli с

823 ным крио-

плазмидой pOF 39. Для возобновления культуры 50 мл бактериальной среды LB (Luria Broth, Sigma), содержащей 50 мкг/мл ампициллина, заражали замороженной культурой и растили в течение ночи при 37°C и перемешивании 200 об./мин. Далее брали шесть колб с 200 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, и добавляли ночную культуру до оптической плотности 0.1 при 600 нм. Продукцию GroEL проводили в течение ночи при 37°С и перемешивании 200 об./мин. Полученную культуру центрифугировали 20 мин при 5000 g и 4°C. Далее отмывали бактериальные клетки (осадок) 50 мМ Трис-HCl-буфером, pH 8.0, от среды, а затем суспендировали в лизирующем буфере (100 мМ Tris-HCl, pH 8.1), содержащем 0.1 мМ ЭДТА, 10 мМ ДТТ и 0.2 мг/мл ингибиторов протеаз (Sigma). Бактериальные клетки разрушали с помощью ультразвуковой обработки (Fisher Bioblock, Illkirch, Франция) пятью импульсами по 40 с при амплитуде 50%. Суспензию центрифугировали 30 мин при 11000 об./мин, после чего последовательно высаливали супернатант сухим $(NH_4)_2SO_4$ до 30 и 80%. Далее центрифугировали препарат при тех же условиях и растворяли осадок в буфере В (50 мМ Tris-HCl, рН 7.2, 0.1 мМ ЭДТА, 2 мМ ДТТ). Полученный раствор диализовали против буфера В в течение ночи. Диализат наносили на колонку с DEAE-Sepharose fast flow (Sigma), уравновешенную буфером В. Элюцию белка проводили градиентом 0-500 мМ NaCl. Хроматографию проводили со скоростью 1-3 мл/мин на хроматографической системе Akta Prime с программным обеспечением Unicorn Control (Amersham Biosciences, Piscatway, США). Собирали фракции в объеме 8 мл и анализировали их методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS. Полученный препарат GroEL, содержащий ~350 мМ NaCl (стабилизирует белок), нагревали в круглодонной колбе на водяной бане до 58°С, после чего остужали до комнатной температуры и добавляли Mg-АТР до конечной концентрации 2 мМ. Затем прогревали смесь до той же температуры в течение 2-3 мин. Данная стадия позволяет GroEL пройти свой естественный цикл и выпустить в среду денатурированные белки E. coli, которые могли сохраниться в полости шаперонина во время выделения. Денатурировавшие белки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 11000 g. Препарат GroEL диализовали против буфера В в течение ночи, а затем повторно очищали на DEAE-Sepharose fast flow по указанной выше методике. Собирали фракции в объеме 6 мл и также анализировали их методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS. Фракции, содержащие очищенный GroEL, объединяли. Очищенный препарат GroEL высаливали сухим (NH₄)₂SO₄ до 80% и хранили при 4°С.

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ том 66 № 5 2021

Получение структуры GroEL по данным крио-ЭМ. Данные крио-ЭМ получены в Ресурсном центре зондовой и электронной микроскопии НИЦ "Курчатовский институт". Вначале поддерживающие сетки для электронной микроскопии с периодическими отверстиями в аморфной пленке углерода (Quantifoil R1.2/1.3, Quantifoil) были обработаны в тлеющем разряде с помощью установки PELCO easiGlow при стандартных условиях: время обработки образца – 30 с, сила тока – 0.25 мА, остаточное давление в камере – 0.26 мБар. Далее на сетку наносили 3 мкл образца GroEL и проводили его витрификацию в камере установки Vitrobot Mark IV при следующих параметрах: сила сжатия при промакивании (Blot force) – 0 единиц, время промакивания (Blot time) – от 2.5 до 3.5 с, температура в камере -4.5° С, влажность в камере - 95-100%. Затем замороженные сетки переносили в криоэлектронный микроскоп Titan Krios 60–300, оборудованный высокоэффективным детектором электронов Falcon II, где проводили съемку изображений с использованием программного обеспечения EPU (FEI). Обработку изображений и построение реконструкций проводили с помощью программных пакетов Warp [27] и CryoSPARC [28]. Всего было снято 675 стеков изображений, из которых 590 стеков были отобраны для дальнейшего анализа. При помощи программного пакета Warp провели коррекцию дрейфа, оценку параметров функции передачи контраста (CTF), а также выбор на изображениях одиночных проекций объекта исследования. Из исходных изображений после пре-процессинга были выделены 47149 проекций одиночных частиц и экспортированы в программный пакет CryoSPARC, где была проведена их двухмерная классификация. Далее выбрали 15 классов, входящие в них частицы были подвергнуты процедуре трехмерной классификации. После чего отобрали 29700 частиц, из которых строили 3D-реконструкцию GroEL с учетом симметрии D7. Разрешение структуры было оценено по критерию FSC = 0.143 и составило 3.02 Å.

Расчет траекторий молекулярной динамики. Атомарная модель апо-формы GroEL для расчетов МД построена в программе СООТ [29] по структуре из крио-ЭМ. 23 остатка С-концевого фрагмента (526-548), не выявленные в плотности, были добавлены вручную с использованием стандартной утилиты Builder программы PyMOL версии 2.2.3 (www.pymol.org). Моделирование проводили с использованием программного пакета Gromacs [30] версии 2020.1 в силовом поле a99SB-disp [31] при постоянной температуре (300 K) и постоянном давлении (1 атм) с применением периодических граничных условий. Температура и давление поддерживались постоянными с помощью алгоритмов V-rescale [32] и Parrinello-Rahman [33] соответственно. Белок помещали в ячей-



Рис. 1. Структура шаперонина GroEL по данным крио-ЭМ, окрашенная в соответствии с локальным разрешением (а). Атомарная модель, использованная в расчетах МД (б). Пунктирная окружность указывает на положение достроенных С-концевых участков.

ку с водой (модель TIP4P-D) 17 × 17 × 18 нм, содержащей 150 мМ NaCl, включая противоионы для нейтрализации суммарного заряда белка (519 Na⁺ и 253 Cl⁻). Электростатические взаимодействия рассчитывали с помощью алгоритма РМЕ с радиусом отсечки 1.2 нм. Радиус отсечки для ван-дер-ваальсовых сил составлял 1.2 нм. Временной шаг интегрирования составил 2 фс. Перед расчетом МД была проведена релаксация системы, включающая этап минимизации энергии с последующим нагреванием системы от 5 до 300 K в течение 5 нс. Длительность траектории МД – 250 нс.

Значения RMSD и RMSF для С α -атомов, а также попарное расстояние между остатками или атомами рассчитаны с помощью стандартных утилит пакета Gromacs. В качестве критерия существования контакта (по типу "солевой мостик") между аминокислотами выбран порог 0.3 нм, который соответствует сумме ван-дер-ваальсовых радиусов *sp*³ N и *sp*³ O [34]. Программное обеспечение MDLovoFit использовали для дифференциального расчета RMSD [35]. С помощью MDLovoFit проводили анализ флуктуаций структуры посредством выравнивания всех подмножеств С α -атомов белка, соответствующих различным долям ϕ – от общего числа С α , и поиска подгруппы с наименьшим значением RMSD.

Для сравнения результатов крио-ЭМ и молекулярной динамики на основании траектории МД построена 3D-карта рассеивающей плотности шаперонина GroEL. Для этого был создан алгоритм для Python 3.6.9 [36], который переводит множество кадров МД в единую 3D-матрицу. Измерения матрицы соответствуют абсциссе, ординате и аппликате пространства, которое содержит координаты шаперонина GroEL, а каждый элемент матрицы пропорционален вероятности нахождения в соответствующем объеме (вокселе) атомов молекулярной модели. В данной работе размер вокселя матрины соответствовал $1 \times 1 \times 1 \text{ Å}^3$. а в формировании значений элементов матрицы участвовали только тяжелые атомы молекулярной модели. Для усреднения использовали 25000 кадров молекулярной траектории, которые были предварительно выровнены прогрессивным алгоритмом программного пакета Gromacs. 23 аминокислоты, расположенные на С-концах субъединиц, при выравнивании не учитывали.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Среднее разрешение структуры тетрадекамера GroEL, полученной по данным крио-ЭМ, составило 3.02 Å. На рис. 1а представлена поверхность GroEL, окрашенная в соответствии с локальным разрешением, которое варьирует от 2.5 до 4.1 Å. Значения от 2.5 до 3 Å характерны для области экваториальных доменов, ответственных за межкольцевые взаимодействия и связывание АТФ. В зоне апикальных доменов, связывающих белкисубстраты и GroES, разрешение падает до 4.1 Å. Эти особенности распределения локального разрешения структуры согласуются с результатами [37] и указывают на большую подвижность апикального домена относительно экваториального. С помощью полученной карты рассеивающей плотности построили атомарную модель тетрадекамера GroEL. 23 аминокислоты С-конца были достроены и добавлены каждой субъединице (рис. 1б).

С этой моделью провели расчет траектории МД длиной 250 нс. На основании траектории была построена 3D-карта рассеивающей плотности шаперонина GroEL (рис. 2), которая аналогично плотности из крио-ЭМ отражает вероятность обнаружить атом (рассеивающий центр) в соответствующей позиции структуры. Карта рассеивающей плотности, полученная из траектории МД, согласуется с картой плотности из крио-ЭМ, демонстрируя большие значения элементов матрицы в области экваториального домена по сравнению с апикальным. Согласие между результатами крио-ЭМ, полученными усреднением структуры по ансамблю частиц, и результатами МД, полученными усреднением по времени, указывает на



Рис. 2. Карта рассеивающей плотности, полученная на основании траектории МД. Представлены три изометрических поверхности, соответствующие высокому (0.39, слева), среднему (0.21, центр) и низкому (0.11, справа) уровням элементов 3D-матрицы рассеивающей плотности шаперонина GroEL.

достаточность собранного в крио-ЭМ числа частиц и продолжительности расчета МД.

Расчет среднеквадратичных флуктуаций (RMSF) С α -атомов каждой субъединицы GroEL в траекториях МД показал, что домены этого белка различаются по своей мобильности, а основной вклад в конформационную подвижность вносят аминокислотные остатки С-конца и апикального домена (рис. 3). Среднее значение RMSF для экваториального домена составляет 0.15 нм, для интермедиального — 0.19 нм, для апикального — 0.27 нм, а для С-концевых остатков превышает 1 нм. Согласно полученным данным наиболее высокая величина флуктуаций упорядоченных частей белка (за исключением С-концов) наблюдается для остатков β -листов 6 и 7 и α -спиралей К и L, расположенных в начале и конце апикального домена соответственно, и может достигать значения 0.9 нм.

Значения среднеквадратичного отклонения (RMSD) координат Сα-атомов от их положения в начальной структуре для всех 14 субъединиц по результатам МД находятся в пределах от 0.27 до 0.33 нм. Отклонения от начальной позиции атомов апикального домена сушественно превышают таковые для экваториального и интермедиального доменов: средние значения RMSD составляют 0.27, 0.19 и 0.17 нм соответственно. Чтобы выяснить, является ли вычисленное значение RMSD апикального домена следствием большего отклонения его начального (стартового) состояния от равновесного (достигнутого в ходе МД) или его большей подвижности, дополнительно был проведен анализ RMSD атомов относительно их положения в предшествующей структуре отдельно для каждого домена, а также выравнивание всевозможных подмножеств атомов одной субъединицы с целью выявления наиболее изменчивых областей с использованием программного пакета MDLovoFit [35]. Проведенный анализ позволил выявить полный набор Сα-атомов одной субъединицы с наименьшим RMSD. Было установлено, что по меньшей мере 60% атомов каждой субъединицы формируют "неподвижное ядро" и могут быть наложены на их исходные позиции в пределах 0.2 нм. Как и в [18], в данном моделировании не все субъединицы претерпевали изменения синхронно, что привело к переменному составу подвижной и неподвижной частей. Тем не менее для 11 из 14 субъединиц набор остатков неподвижного ядра совпадает на 79%. Рисунок 4а демонстрирует усредненное изменение во времени субъединицы целиком (средняя линия) и выявленных стабильных (нижняя линия) и высоко подвижных участков (верхняя линия). Ато-



Рис. 3. Различия в подвижности доменов GroEL в ходе траекторий МД. График RMSF Сα-атомов субъединицы белка (а). Жирной линией показаны усредненные по 14 субъединицам значения. Бледной широкой полосой показан диапазон значений RMSF каждого остатка. Ход основной цепи (показаны только Сα-атомы) субъединицы GroEL (б), раскрашенный в соответствии со шкалой значений В-фактора (внизу).

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ том 66 № 5 2021



Рис. 4. Оценка RMSD Сα-атомов одной субъединицы. RMSD как функции времени Сα-атомов: субъединицы целиком; 60% атомов, составляющих неподвижное ядро субъединиц; оставшиеся 40% атомов, претерпевающих наибольшие изменения. Соответствующим бледным цветом закрашены диапазоны значений RMSD для 14 субъединиц (а). Суперпозиция фреймов МД. Неподвижное ядро показано темным, 40% наиболее подвижных атомов – светлым (б). Структуры ориентированы подобным рис. 36 образом. Видно, что в подвижную часть входят апикальный домен, С-концы и участки петель других доменов. Профиль распределения значений RMSD атомов относительно их положения в предшествующей структуре (Δt 50 пс) экваториального, интермедиального и апикального доменов (в).

мы, входящие в подвижную группу, отклоняются от исходной структуры более чем на 0.6 нм и преимущественно входят в состав апикального домена, а также неупорядоченных С-концов (рис. 46, светлым). Неподвижное ядро быстро приходит к равновесному положению и не изменяет своей структуры на протяжении проведенной МД (рис. 46, темным).

Анализ RMSD относительно предшествующего по времени положения атомов показывает различную скорость изменения положения атомов в разных доменах (рис. 4в). За выбранный интервал времени (500 пс) экваториальный и интермедиальный домены изменяют свои структуры в пределах 0.06–0.07 нм, тогда как изменения RMSD

Таблица 1. Коэффициенты корреляции (*r*) для пары контактов Arg452–Glu461 и Glu461–Arg452 соответствующих субъединиц, находящихся в межмолекулярном контакте двух колец

| Пара взаимодействующих субъединиц | r |
|--------------------------------------|--------|
| A–K | -0.824 |
| B–J | -0.693 |
| C–I | -0.500 |
| D-H | -0.541 |
| E-N | -0.564 |
| F-M | -0.923 |
| G–L | -0.897 |

апикального домена лежат в диапазоне 0.07– 0.09 нм. Проведенный анализ подвижности шаперонина GroEL по результатам МД дает численные оценки разнородной подвижности доменов этого белка и дополняет качественную картину структурной динамики этой макромолекулы, полученную в рамках крио-ЭМ.

В рамках работы особое внимание уделено динамике пяти физиологически значимых аминокислотных контактов (рис. 5). Несмотря на отсутствие в стартовой модели непосредственного контакта между боковыми цепями внутрисубъединичных пар остатков Arg58-Glu209 и Asp83-Lys327, эти солевые мостики образуются в ходе динамики. Расстояние между парой тяжелых атомов солевого мостика Glu409-Arg501 остается постоянным (0.28 нм) на протяжении всего моделирования. Время жизни солевых мостиков, формируемых между субъединицами одного кольца, составляет ~95% от времени МД.

Стабилизация межмолекулярного взаимодействия колец достигается за счет двух (в каждой паре субъединиц) солевых мостиков Arg452-Glu461. Анализ корреляции между образующимися контактами выявил, что наличие одного из контактов в паре связано с уменьшением вероятности образования другого (табл. 1). Описанное в литературе взаимодействие между кольцами посредством контактов Lys105-Ala109 не было реализовано в ходе МД, однако остатки Lys105-Ala109 одной субъединицы образуют перманентную водородную связь между атомами основной цепи.



Рис. 5. Наблюдаемые в ходе МД солевые мостики, образованные между доменами и субъединицами GroEL: а – карта солевых мостиков. По оси ординат указана пара остатков, образующих солевой мостик; б – диаграмма среднего для 14 субъединиц времени жизни изучаемых контактов, выраженное в процентах от времени моделирования.



Рис. 6. Тепловая карта матрицы контактов С-концевых фрагментов с субъединицами. Цветовая шкала соответствует заселенности попарных контактов, выраженной в процентах от времени траектории.

В выполненных расчетах высокоподвижные С-концевые фрагменты белка формируют неупорядоченную сеть контактов между собой, а также взаимодействуют с другими доменами субъединиц своего кольца. Карта контактов (рис. 6) показывает, что помимо взаимодействия со своей субъединицей С-концы часто связываются с двумя соседними субъединицами в кольце.

Замечено, что существует различие в частоте образования контактов С-конца субъединицы с двумя соседними субъединицами кольца. С большей вероятностью С-конец связывается с внутренней поверхностью субъединицы, расположенной следующей по часовой стрелке (при взгляде со стороны апикальных доменов). Это наблюдение можно объяснить структурой белка, в которой С-конец структурированной части эква-

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ том 66 № 5 2021

ториального домена одной субъединицы расположен ближе к следующей по часовой стрелке субъединице, что делает более вероятным образование контакта. Отметим, что С-концы редко образуют контакты с субъединицами, расположенными более чем через одного соседа, хотя в ходе проведенной МД были обнаружены контакты между удаленными друг от друга субъединицами В и Е.

Проведенное исследование иллюстрирует эффективное взаимодействие между экспериментальным (крио-ЭМ) и теоретическим (МД) подходами для изучения структурной динамики белка на примере шаперонина GroEL. Рассеивающая плотность, полученная в результате исследования крио-ЭМ, является не только отправной точкой для создания молекулярной модели для проведения МД, но и позволяет качественно оценить относительную подвижность отдельных доменов белкового комплекса. Как показано в работе, такая качественная оценка может быть сравнена с результатом расчета МД и являться способом его верификации. В свою очередь метод МД позволяет оценить количественные характеристики молекулярной подвижности, динамический характер образования и разрыва конкретных связей, а также рассмотреть крайне подвижные части белка, структуру которых невозможно реконструировать при помощи крио-ЭМ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-20055).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Maio A.D.* // Shock. 1999. V. 11. № 1. P. 1. https://doi.org/10.1097/00024382-199901000-00001
- Bose D., Chakrabarti A. // IUBMB Life. 2017. V. 69. № 9. P. 647.
- https://doi.org/10.1002/iub.1656
- Skjaerven L., Cuellar J., Martinez A., Valpuesta J.M. // FEBS Lett. 2015. V. 589. P. 2522. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.06.019
- Yebenes H., Mesa P., Munoz I.G. et al. // Trends Biochem. Sci. 2011. V. 36. №8. P. 424. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.05.003
- 5. *Hertveldt K., Lavigne R., Pleteneva E. et al.* // J. Mol. Biol. 2005. V. 354. № 3. P. 536. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.08.075
- Kurochkina L.P., Semenyuk P.I., Orlov V.N. et al. // J. Virology. 2012. V. 86. № 18. P. 10103. https://doi.org/10.1128/jvi.00940-12
- Stanishneva-Konovalova T.B., Semenyuk P.I., Kurochkina L.P. et al. // J. Struct. Biol. 2020. V. 209. № 2 P. 107439. https://doi.org/10.1016/i.jsb.2019.107439
- Sparrer H., Lilie H., Buchner J. // J. Mol. Biol. 1996. V. 258. №1. P. 74.
- https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0235 9. *Grallert H., Buchner J.* // J. Struct. Biol. 2001. V. 135.
- № 2. P. 95. https://doi.org/10.1006/jsbi.2001.4387
- 10. Horwich A.L., Farr G.W., Fenton W.A. // Chem. Rev. 2006. V. 106. № 5. P. 1917. https://doi.org/10.1021/cr040435v
- Lorimer G.H., Fei X., Ye X. // Philos. Trans. R. Soc. London. B. 2018. V. 373 (1749). P. 20170179. https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0179
- Ludtke S.J., Baker M.L., Chen D.-H. et al. // Structure. 2008. V. 16 (3). P. 441. https://doi.org/10.1016/j.str.2008.02.007
- Ranson N.A., Clare D.K., Farr G.W. et al. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2006. V. 13 (2). P. 147. https://doi.org/10.1038/nsmb1046
- Saibil H.R., Fenton W.A., Clare D.K., Horwich A.L. // J. Mol. Biol. 2013. V. 425. № 9. P. 1476. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.11.028
- 15. Sot B., Galán A., Valpuesta J.M. et al. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 37. P. 34024. https://doi.org/10.1074/jbc.m205733200

- Ma J., Sigler P.B., Xu Z., Karplus M. // J. Mol. Biol. 2000. V. 302. № 2. P. 303. https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4014
- 17. *Ranson N.A., Farr G.W., Roseman A.M. et al.* // Cell. 2001. V. 107. № 7. P. 869. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00617-1
- Piana S., Shaw D.E. // J. Phys. Chem. B. 2018. V. 122. № 49. P. 11440. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.8b07366
- 19. Brocchieri L., Karlin S. // Protein Science. 2008. V. 9.
 № 3. P. 476. https://doi.org/10.1110/ps.9.3.476
- 20. *Mclennan N.F., Girshovich A.S., Lissin N.M. et al.* // Mol. Microbiol. 1993. V. 7. № 1. P. 49. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01096.x
- Tang Y.-C., Chang H.-C. Roeben A. et al. // Cell. 2006.
 V. 125. № 5. P. 903.
- https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.027
 22. Machida K., Kono-Okada A., Hongo K. et al. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. № 11. P. 6886. https://doi.org/10.1074/jbc.m708002200
- Weaver J., Rye H.S. // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. № 33. P. 23219. https://doi.org/10.1074/jbc.m114.577205
- 24. *Ishino S., Kawata Y., Taguchi H. et al.* // J. Biol. Chem. 2015. V. 290. № 24. P. 15042.
- https://doi.org/10.1074/jbc.m114.633636
 25. Chen D.-H., Madan D., Weaver J. et al. // Cell. 2013. V. 153. № 6. P. 1354. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.052
- 26. Dalton K.M., Frydman J., Pande V.S. // PLoS ONE.
 2015. V. 10. P. e0117724. № 3. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117724
- 27. Tegunov D., Cramer P. // Nat. Methods. 2019. V. 16. № 11. P. 1146.
- https://doi.org/10.1038/s41592-019-0580-y
 28. Punjani A., Rubinstein J.L., Fleet D.J., Brubaker M.A. // Nat. Methods. 2017. V. 14. № 3. P. 290.
- https://doi.org/10.1038/nmeth.4169
 29. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. № 4. P. 486. https://doi.org/10.1107/s0907444910007493
- Abraham M.J., Murtola T., Schulz R. et al. // SoftwareX. 2015. V. 1. P. 19. https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001
- Robustelli P., Piana S., Shaw D.E. // Proc. Natl Acad. Sci. 2018. V. 115 (21). https://doi.org/10.1073/pnas.1800690115
- 32. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. // J. Chem. Phys. 2007. V. 126. № 1. P. 014101. https://doi.org/10.1063/1.2408420
- Parrinello M., Rahman A. // J. Appl. Phys. 1981. V. 52. № 12. P. 7182. https://doi.org/10.1063/1.328693
- Tsai J., Taylor R., Chothia C., Gerstein M. // J. Mol. Biol. 1999. V. 290. № 1. P. 253. https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2829
- 35. *Martínez L.* // PLoS ONE. 2015. V. 10. № 3. P. e0119264. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119264
- Python Release Python 3.6.9. *Python.org*. Retrieved from https://www.python.org/downloads/release/python-369/
- 37. *Roh S.-H., Hryc C.F., Jeong H.-H. et al.* // Proc. Natl Acad. Sci. 2017. V. 114. № 31. P. 8259. https://doi.org/10.1073/pnas.1704725114

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ том 66 № 5 2021