Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

На правах рукописи

МИНЕЕВ Константин Сергеевич

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ОЛИГОМЕРИЗАЦИИ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

02.00.10 - биоорганическая химия

Диссертация на соискание учёной степени
доктора химических наук

Научный консультант:
д.х.н., профессор, Арсеньев А.С.

Москва-2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ....5
Глава 1. Обзор Литературы. Методы исследования структуры мембранных белков при помощи спектроскопии ЯМР....11
1.1. Мембраноподобные среды....11
1.1.1. Органические растворители....13
1.1.2. Детергенты....13
1.1.3. Бицеллы....16
1.1.4. Липид-белковые нанодиски....19
1.1.5. Липодиски....23
1.1.6. Полимеры....24
1.1.7. Методы солюбилизации мембранных белков в мембраноподобных средах....25
1.1.8. Рациональные подходы к выбору мембраноподобного окружения....26
1.1.9. Влияние окружения на структуру мембранных белков....30
1.2. Изотопное мечение....35
1.2.1 Системы для гетерологической продукции изотопно-меченых белков....35
1.2.2. Тотальное мечение....41
1.2.3 Дейтерирование....42
1.2.4. Альтернативное мечение....43
1.2.5. Селективное мечение....44
1.2.6. Комбинаторное мечение....48
1.2.7. Сайт-специфическое мечение фтором....49
1.2.8. Сегментное мечение....52
1.3. Методики ЯМР для работы с большими белками....56
1.3.1. Оптимизация поперечной релаксации. ^{1}H-^{15}N-TROSY....56
1.3.2. Оптимизация поперечной релаксации. Спектроскопия TROSY для алифатических и ароматических ^{13}C-^{1}H систем....58
1.3.3. Новые датчики и эксперименты TROSY с детекцией по ^{15}N....60
1.3.4. Оптимизация переноса поляризации - CRIPT, CRINEPT....61
1.3.5. Оптимизация продольной релаксации и "быстрая" ЯМР-спектроскопия....64
1.3.6. Новые методы определения пространственной структуры для изучения массивных объектов....71
Глава 2. Обзор Литературы. Методы измерения свободной энергии взаимодействия мембранных белков....76
2.1 SDS-электрофорез....76
2.2. Ультрацентрифугирование....78
2.3. Индуктивно-резонансный перенос энергии....79
2.4. Изотермическая титрационная калориметрия....79
2.5. Подходы на основе генной инженерии....80
Глава 3. Краткая характеристика объектов исследования....82
Глава 4. Разработка методов анализа свойств мембраноподобных сред, параметры малых изотропных бицелл различного состава....87
4.1. Модель идеальной бицеллы....88
4.2. Разработка методики измерения размера бицелл....91
4.3. Параметры бицелл на основе CHAPS....100
4.4. Параметры бицелл на основе CHAPSO и холиевой кислоты....103
4.5. Параметры бицелл на основе детергентов Façade....106
4.6. Параметры бицелл на основе DH_7PC....112
4.7. Параметры бицелл, приготовленных из липидов с варьируемыми ацильными цепями.. 114

4.8. Оптимальные методы приготовления бицелл, методы контроля размера частиц.....117
4.9. Характеристики бицелл со встроенным ТМ белком.....121
4.9.1. Влияние белка на структуру бицеллы.....121
4.9.2. Структура и динамика ТМ домена внутри бицелл различного состава.....125
4.9.3. Взаимодействия белок-липид.....128
4.9.4. Влияние ободообразующего агента на структуру водорастворимых доменов белков. 129
4.10 Разработка методики детекции фазовых переходов в изотропных бицеллах.....134
4.11 Влияние состава бицелл на параметры фазовых переходов в изотропных бицеллах.…141
4.11.1. Влияние q'.....141
4.11.2. Влияние структуры липидов.....142
4.11.3. Влияние ободообразующего детергента.....144
4.11.4. Большие бицеллы и ЛБН.....149
4.11.5 Зависимость от концентрации.....150
4.12. Причины возникновения температурно-зависимого роста бицелл.....152
4.13. Сравнение различных ободообразующих агентов.....154
4.14. Критерии корректности формирования бицелл.....157
4.15. Поведение изотропных бицелл из наиболее распространённых липидов.....159
4.15.1. Этаноламины.....159
4.15.2. Сфингомиелины.....159
4.15.3. Анионные липиды.....162
4.15.4 Смешанные бицеллы ФХ/ФГ.....163
4.15.5 Смешанные бицеллы из липидов с различными ж.-к. остатками.....168
4.15.6 Смешанные бицеллы ФХ/холестерин.....171
4.16. Заключение.....174
Глава 5. Разработка методов определения структуры димеров мембранных белков.....176
5.1. Изотопная фильтрация.....176
5.1.1. Первая структура димера МБ на основании данных изотопной фильтрации.....176
5.1.2. Оптимизация метода изотопной фильтрации.....179
5.1.3. Использование эволюции с постоянным временем и гомоядерной развязки.....186
5.2. Картирование изменений химических сдвигов и параметров подвижности.....192
5.2.1. Химические сдвиги ^{15}NH.....195
5.2.2. Химические сдвиги ^{13}CH.....196
5.2.3. КССВ C-C/N.....197
5.2.4 Параметры подвижности метильных групп.....197
5.2.5. Предсказание пространственных структур димеров ТМ доменов на основании изменений измеряемых величин.....200
5.3. Практическое применение методик для определения структур димеров МБ.....204
5.3.1. Структуры димерных ТМ доменов РТК.....204
5.3.2. Структуры ТМ доменов TLR.....208
5.4. Заключение.....219
Глава 6. Разработка методов измерения свободной энергии и кинетики взаимодействия мембранных белков в мембраноподобных средах.....221
6.1. Определение заселенностей олигомерных форм.....221
6.2. Модели равновесия и константа димеризации.....226
6.2.1. Димеризация в мицеллах.....226
6.2.2. Димеризация в бицеллах.....230
6.3. Кинетика димеризации МБ.....233
6.4. Практическое применение разработанных методик.....236
6.4.1. Анализ влияния точечных мутаций.....236

6.4.2. Изучение влияния окружения на стабильность и структуру димеров МБ.....241
6.4.3. Анализ сложного равновесия олигомерных форм ТМД.....245
6.4.4. Взаимосвязь структура-энергия.....247
6.5. Преимущества и недостатки предложенных подходов.....249
6.6. Заключение.....251
Глава 7. Методы исследования структуры крупных фрагментов клеточных рецепторов.....252
7.1. Формулировка подхода.....252
7.2. Конструкции, содержащие ТМ домены и примембранные регионы.....253
7.2.1. EGFR/HER.....253
7.2.2. Рецептор нейротрофина p75NTR.....258
7.3. Конструкции, содержащие ТМ домены и внутриклеточные домены.....261
7.3.1. Исследование конструкции p75-ΔECD.....261
7.3.2. Полученные данные в контексте механизма активации p75NTR.....268
7.4. Полноразмерные белки - структура NRADD.....271
7.5. Заключение.....274
8. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....275
8.1. Материалы.....275
8.1.1. Растворители.....275
8.1.2. Липиды.....275
8.1.3. Белки.....275
8.2. Приготовление образцов.....278
8.3. Спектроскопия ЯМР.....280
8.3.1. Измерение коэффициентов самодиффузии.....281
8.3.2. Отнесение сигналов.....282
8.3.3. Анализ и определение пространственной структуры.....282
8.3.4. Измерение параметров ЯМР-релаксации.....283
8.3.5. Измерение pKa ионогенных групп.....284
8.3.6. Измерение энергии димеризации.....284
8.4. Расчёты.....284
8.5. Иллюстрации.....285
8.6. Базы данных.....285
ВЫВОДЫ.....286
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....288
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....291

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Мембранным белкам (МБ) соответствует не менее 30% кодирующих последовательностей генома человека, они регулируют важнейшие процессы в клетках, такие как транспорт веществ через мембрану, передача сигналов, поддержание или изменение мембранного потенциала. Более того, большинство лекарственных средств специфически воздействуют именно на МБ. Одной из важнейших характеристик белка является его пространственная структура. Знание о структуре белка позволяет проводить, например, рациональную разработку лекарственных средств с использованием компьютерного моделирования, что может существенно снизить расходы на поиск новых лекарств. С другой стороны, данные о пространственной структуре белков должны в будущем позволить установить взаимосвязь между их структурой и функцией, оптимизировать расчётные методы предсказания их свойств, проектировать новые белки с заранее заданными свойствами.

Несмотря на свою очевидную значимость, на момент начала данной работы информация о пространственной структуре МБ была ограниченной и разрозненной. Так, в 2005 году, когда автор только приступил к научной работе, в базе данных Protein Data Bank (PDB) можно было найти не более 500 структур белков, содержащих трансмембранный домен (ТМД) [1]. При этом всего в базе содержалось около 34 000 записей. Иными словами, представленность в PDB класса белков, являющихся основными мишенями для разработки новых лекарств, не превышала 2%. Стоит отметить, что данная закономерность в целом сохраняется, на текущий момент (2018 г.) PDB содержит более 140 000 структур, из которых чуть более 3 000 (2.7%) содержат ТМД. Дополнительно, структура ряда МБ исследуется по частям. Белок разделяют на отдельные домены, для некоторых доменов получают пространственные структуры, затем суммируют имеющуюся информацию и строят модель полноразмерной молекулы. Такой подход позволил получить частичную информацию о пространственной организации еще 8000 МБ (на 2018 г.), что расширило представленность МБ в PDB до 12%. С другой стороны, разделение на отдельные домены зачастую сопряжено с потерей информацией об устройстве ТМ частей белков, которые могут служить мишенями для некоторых лекарств [2], а также приводит к потере фундаментально важной информации о том, каким образом осуществляется взаимосвязь между состояниями отдельных доменов и функционирование белков в целом.

Основной причиной недостаточной исследованности МБ являются трудности с их кристаллизацией. Кристаллизация растворимого белка сейчас является практически рутинной задачей (хоть и не всегда выполнимой), однако, МБ содержат части, которые нужно помещать в

различное окружение - гидрофобное и полярное. В последнее время удалось получить кристаллы многих белков с использованием липидной кубической фазы [3], тем не менее, ряд классов МБ, в первую очередь МБ с одним ТМ сегментом, так никогда и не были закристаллизованы. В связи с этим для исследования структуры МБ активно применяется спектроскопия ЯМР в растворе. Использование ЯМР высокого разрешения сопряжено с рядом ограничений, которые, в первую очередь, касаются размера объекта исследований. Для МБ это особенно актуально, поскольку такие белки необходимо помещать в мембраноподобные среды (МПС), которые обычно формируют частицы, размер которых близок к предельно допустимому для исследования с использованием классических подходов ЯМР-спектроскопии. Поэтому, необходимо оптимизировать МПС, чтобы получить частицы, способные адекватно имитировать клеточную мембрану, при этом имеющие малый размер, а также улучшать непосредственно методы ЯМР-спектроскопии, чтобы иметь возможность работать с объектами большого размера.

Стоит отметить, что многие МБ функционируют за счет белок-белковых взаимодействий в клеточной мембране. Поэтому, помимо пространственной структуры отдельных молекул необходимо исследовать интерфейсы межмолекулярных взаимодействий. Поскольку активация некоторых МБ сопряжена с изменением конформации их ТМ доменов, нужно разработать подходы для измерения свободной энергии отдельных конформаций доменов, чтобы количественно оценивать влияние точечных мутаций, а также функционально значимых взаимодействий. Наконец, клеточная мембрана является основным участником всех процессов, осуществляемых МБ. В связи с этим представляется важным изучить влияние отдельных компонентов мембранного окружения на структуру, подвижность и функцию МБ. Большинство перечисленных выше проблем можно решить с использованием ЯМР-спектроскопии высокого разрешения.

Целью данной работы являлась разработка методов исследования пространственной структуры, внутримолекулярной подвижности, а также термодинамических и кинетических параметров функционально значимых взаимодействий мембранных белков в различных мембраноподобных средах с использованием спектроскопии ЯМР высокого разрешения.

Для выполнения вышеописанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать методы исследования свойств мембраноподобных сред, разработать новые составы, способные сохранить нативную структуру мембранных белков.

2. Разработать и опробовать методы для детекции межмолекулярных взаимодействий и быстрого картирования интерфейсов димеризации МБ.

3. Разработать и опробовать методики измерения свободной энергии и других термодинамических и кинетических параметров димеризации МБ.

4. Изучить возможность исследования крупных фрагментов МБ, содержащих как ТМ, так и глобулярные домены или примембранные регионы, при помощи спектроскопии ЯМР в растворе.

Решение поставленных задач должно было привести к появлению набора новых методов для исследования МБ и МПС.

В качестве модельных объектов использовались α-спиральные белки с одним ТМ сегментом, активные в виде гомо- и гетеродимеров - рецепторные тирозинкиназы (РТК) семейств EGFR/HER и VEGFR, гликофорин А, толл-подобные рецепторы TLR3 и TLR4, рецепторы нейротрофинов TrkA и p75. Были исследованы белковые конструкции, содержащие только ТМ домен, ТМ домен с добавлением примембранного региона, а также ТМ домен с добавлением полноразмерного внутриклеточного домена. Для выполнения работы применялись такие методы, как измерение коэффициентов диффузии при помощи импульсных градиентов магнитного поля, одномерная спектроскопия ЯМР ^{1}H и ^{31}P, многомерная гетероядерная спектроскопия ЯМР. Объекты исследования были получены с тотальным мечением стабильными изотопами азота и углерода методом гетерологической продукции в культурах клеток E.Coli или в бесклеточной системе сопряжённых трансляции/транскрипции.

Научная новизна и практическая значимость работы: Несмотря на то, что фосфолипидные бицеллы используются в ЯМР-спектроскопии с середины 1980х [4,5], до последнего времени большинство работ были посвящены поведению больших бицелл, способных спонтанно ориентироваться в магнитном поле. В представленной работы был предложен универсальный метод для измерения размера, концентрации "свободного" детергента и определения фазового состояния бицелл. При помощи этой методики была получена информация о свойствах нескольких десятков различных составов бицелл, которая в дальнейшем может быть использована при планировании экспериментов. Применяя разработанные "модели идеальной бицеллы" можно легко предсказать размер и свойства частиц МПС, в зависимости от концентрации и свойств отдельных компонентов смеси липидов и детергентов. Были получены данные, о том, какие смеси образуют бицеллы и, соответственно, могут применяться в структурных исследованиях, а также о том, какие липиды и детергенты не

следует рассматривать при планировании экспериментов. В работе впервые предложено использовать детергенты типа "Façade" в качестве ободообразующих агентов для малых изотропных бицелл, продемонстрированы преимущества этих ПАВ перед классическими детергентами в отношении белков, содержащих растворимые глобулярные домены, склонные к денатурации.

В рамках работы были разработаны новые импульсные последовательности ЯМР-спектроскопии, которые могут применяться для сверхточной детекции межмолекулярных контактов, предложены новые методы картирования интерфейсов и предсказания структуры димеров МБ. С использованием методик ЯМР были определены 12 новых пространственных структур МБ в различных олигомерных формах. Данные структуры расширили текущие представления о возможных конформациях димеров ТМД, а также о механизмах активации ряда белков. Впервые показано, что толл-подобные рецепторы содержат чрезвычайно длинные ТМ α-спирали, которые включают в себя заряженные аминокислоты и богаты ароматическими остатками. Это позволило объяснить ряд обнаруженных ранее особенностей в поведении TLR и построить первую компьютерную модель TLR, основанную на экспериментальных данных о структуре всех трёх доменов белка.

Были предложены новые методы измерения свободной энергии взаимодействия МБ в частицах МПС. Это позволило впервые экспериментально описать изменения структуры и стабильности димера ТМ домена, происходящие под действием точечных мутаций, вызывающих активацию полноразмерного белка, что проливает свет на конформацию димера ТМД в различных функциональных состояниях рецептора. С использованием разработанных подходов было изучено влияние свойств окружения на структуру и стабильность димеров ТМ доменов МБ. Впервые было показано, что параметры МПС могут поменять структуру димера ТМ домена, а также влиять на структурированность примембранных регионов. Эксперименты, проведённые в бицеллах, позволили оценить влияние толщины бислоя на свободную энергию димеризации ТМ доменов рецептора HER4. В целом, разработанный подход позволяет уйти от простой схемы "структура - функция", которая не даёт понимания механики функционирования различных МБ, и оперировать на более сложном уровне "ансамбль состояний - энергия состояний - подвижность - окружение - функция", а также пересмотреть роль липидного окружения в процессах активации ряда клеточных рецепторов.

Впервые методами спектроскопии ЯМР была изучена структура белка, содержащего как ТМ, так и глобулярный структурированный водорастворимый домены. Структура и динамика рецептора p75 с делецией внеклеточного домена, а также полноразмерного белка NRADD были

изучены в липид-белковых нанодисках и бицеллах. Автору удалось показать, что цитоплазматические примембранные участки длиной в 70 а.о. NRADD и p75 являются высокоподвижными и неупорядоченными и не взаимодействуют с поверхностью липидной мембраны. Показано, что движения глобулярного "домена смерти" p75 никак не сцеплены с движениями ТМ домена белка, как в мономерной, так и в димерной форме, что противоречит общепринятому механизму активации белка. На основании полученных данных были предложены новые механизмы активации p75NTR, которые согласуются как с результатами экспериментов in vitro, так и с информацией о структуре и подвижности различных частей рецептора.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработан подход для изучения структуры частиц в смесях липид/детергент. Показано, что в бицеллах малого размера фосфолипиды претерпевают фазовый переход между гелевым и жидкокристаллическим состояниями, что подтверждает наличие в них липидного бислоя. Липиды в бицеллах воспроизводят поведение липидов в бислоях и липид/белковых нанодисках. В непосредственной близости от трансмембранного белка в бицеллах находятся преимущественно фосфолипиды.
2. Измерены параметры бицелл из различных липидов и детергентов. Показано, что малые изотропные бицеллы не могут быть образованы при использовании анионных липидов, фосфатидилэтаноламина, смесей сфингомиелина с холестерином. Частицы корректной формы получаются на основе фосфатидилхолина, в том числе в смеси с анионными липидами до 1:1 и холестерином до 9:1, сфингомиелина.
3. Предложены бицеллы на основе детергентов Façade-EM и Façade-EPC с повышенной температурной стабильностью. Использование Façade-EM позволяет получать нативно свёрнутые мембранные белки, содержащие глобулярные водорастворимые домены.
4. Разработана методика определения структуры димеров ТМ доменов МБ на основе ЯМР-спектроскопии. Получены 12 пространственных структур димеров и две структуры тримеров МБ. Результаты исследования позволили расширить представления о движущих силах спираль-спиральных взаимодействий в МБ, идентифицировать параметры активного и неактивного состояний димеров ТМД РТК, предложить новые механизмы активации рецепторов.
5. Изучена предсказательная сила различных параметров ЯМР амидных и метильных групп МБ в отношении интерфейсов димеризации. Показано, что химические сдвиги метильных групп имеют ограниченную предсказательную силу, а скорость вращения метильных групп вокруг оси CC' является надёжным индикатором интерфейсов димеризации. Разработан подход для

построения моделей димеров МБ на основании изменений параметров метильных групп, который был применён для анализа структуры димера ТМД TLR4. Построена первая модель полноразмерного TLR в димерном состоянии, основанная на экспериментальных данных о конформации всех трёх доменов рецептора.

6. Разработана методика для определения свободной энергии димеризации и олигомеризации МБ в мицеллах и бицеллах. Методика имеет ряд преимуществ перед аналогами. С применением методики найден механизм запуска спонтанной активации VEGFR2 точечными заменами неполярных аминокислот на Glu в ТМ домене. Изучено влияние состава липидного окружения на структуру и стабильность димера ТМД. Измерена свободная энергия димеризации 11 белков.

7. Исследована структура и динамика ТМД EGFR, HER2, TLR4 и p75NTR с цитоплазматическими примембранными регионами. Показано, что наличие примембранных регионов может влиять на структуру ТМ домена. Домен "чоппер" p75 NTR неструктурирован и не взаимодействует с мембраной, а гидрофобный примембранный регион TLR4 на самом деле является частью трансмембранного домена рецептора.

8. Исследована структура и динамика конструкции, содержащей ТМ и внутриклеточный домен рецептора p75NTR (21 кДа), а также полноразмерного ТМ белка NRADD (25 кДа). Показано, что эктодомен NRADD, а также цитоплазматические примембранные участки длиной в 70 а.о. NRADD и p75 являются высокоподвижными и неупорядоченными и не взаимодействуют с поверхностью липидной мембраны. Движения домена смерти p75 никак не сцеплены с движениями трансмембранного домена белка, как в мономерной, так и в димерной форме, что опровергает принятый ранее механизм активации рецептора.

Аппробация работы. Материалы работы были представлены в стендовых и устных докладах, на 17 конференциях и симпозиумах, в том числе на международных конгрессах по магнитному резонансу EUROMAR 2009, ICMRBS 2012, EUROMAR 2013, EUROMAR 2015, EUROMAR 2017, ISMRBS 2018 (Гётеборг, Швеция, 2009; Лион, Франция, 2012; Херсонес, Крит, 2013; Прага, Чехия, 2015; Варшава, Польша, 2017; Дублин, Ирландия, 2018) , на конгрессе Американского Биофизического Сообщества 2012 (Сан-Диего, США), на нескольких конгрессах FEBS (Турин, Италия, 2011; Париж, Франция, 2014; Иерусалим, Израиль, 2017; Прага, Чехия, 2018), на V и VI съездах биохимиков России (Дагомыс, Россия, 2016 и 2019) и на объединённом научном форуме (Москва, Россия, 2017), на X, XI и XII чтениях, посвящённых памяти академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 2011, 2013, 2017). По теме диссертации опубликованы 24 статьи в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах.

Глава 1. Обзор Литературы. Методы исследования структуры мембранных белков при помощи спектроскопии ЯМР.

1.1. Мембраноподобные среды

Работая с МБ, исследователи сталкиваются с рядом проблем. Во-первых, многие МБ, включая все белки I типа (с одним ТМ сегментом), подвижны и зачастую содержат неупорядоченные участки, что препятствует их кристаллизации и исследованиям методами крио-электронной микроскопии. Рекомбинантные МБ достаточно сложно получить: выходы белка в эукариотических системах чрезвычайно малы, а ренатурация МБ из телец включения клеток бактерий является далеко не простой задачей. Некоторые МБ содержат как внеклеточные, так и внутриклеточные домены, которым для обретения нативной структуры требуются различные окислительно-восстановительные параметры окружения: остатки цистеинов образуют дисульфидные связи вне клеток, но при этом должны существовать в восстановленном состоянии в цитоплазме. Наконец, все МБ требуют особого окружения, в клетке представленного мембраной. Большинство методов структурной биологии не могут применяться на живых клетках и даже на липосомах, поэтому необходимо использовать мембраноподобные среды, которые содержат искусственные компоненты, влияющие на белки-объекты исследования. Эта проблема является особенно актуальной при использовании ЯМР спектроскопии высокого разрешения (в растворе).

ЯМР спектроскопия в растворе является наиболее мощным методом структурной биологии с точки зрения количества представляемой информации. Помимо определения пространственных структуры макромолекул в высоком разрешении, ЯМР используется для исследования внутримолекулярной подвижности, для изучения конформационных переходов, для измерения кинетических и термодинамических параметров различных процессов. Однако, широкому распространению ЯМР-спектроскопии препятствуют ряд экспериментальных трудностей. Основным ограничивающим фактором метода является размер объекта исследования. Большие молекулы медленно двигаются в растворе, что приводит к усилению поперечной релаксации, уширению сигналов, потере чувствительности и разрешения в спектрах ЯМР. Вдобавок, большие молекулы содержат много ядер, активных в спектрах ЯМР, в результате спектры становятся "перенаселенными", вырожденными, не поддающимися интерпретации. Эта проблема была в некоторой части решена последними технологическими

прорывами в области ЯМР и биоинженерии (см. раздел 1.2). Однако, размер молекул/комплексов молекул, исследуемых при помощи ЯМР в растворе редко превышает 50-70 кДа. Работа с объектами большей массы обходится чрезвычайно дорого, как по времени, так и по финансовым затратам. Следовательно, если требуется изучить МБ методами ЯМР высокого разрешения, мембраноподобная среда должна формировать частицы, которые имеют сравнительно малый размер и в то же время должна походить на липидный бислой и воспроизводить свойства настоящей клеточной мембраны. Стандартные мембраноподобные среды для ЯМР-спектроскопии высокого разрешения достаточно полно описаны в нескольких статьях [6–10]. В этой связи, ниже будет представлен только краткий анализ основных типов доступных для применения мембраноподобных сред (Рис. 1), а затем будет обсуждаться основная проблема исследования МБ - подходы для рационального подбора и оптимизации мембраноподобной среды для нужд конкретного исследования.

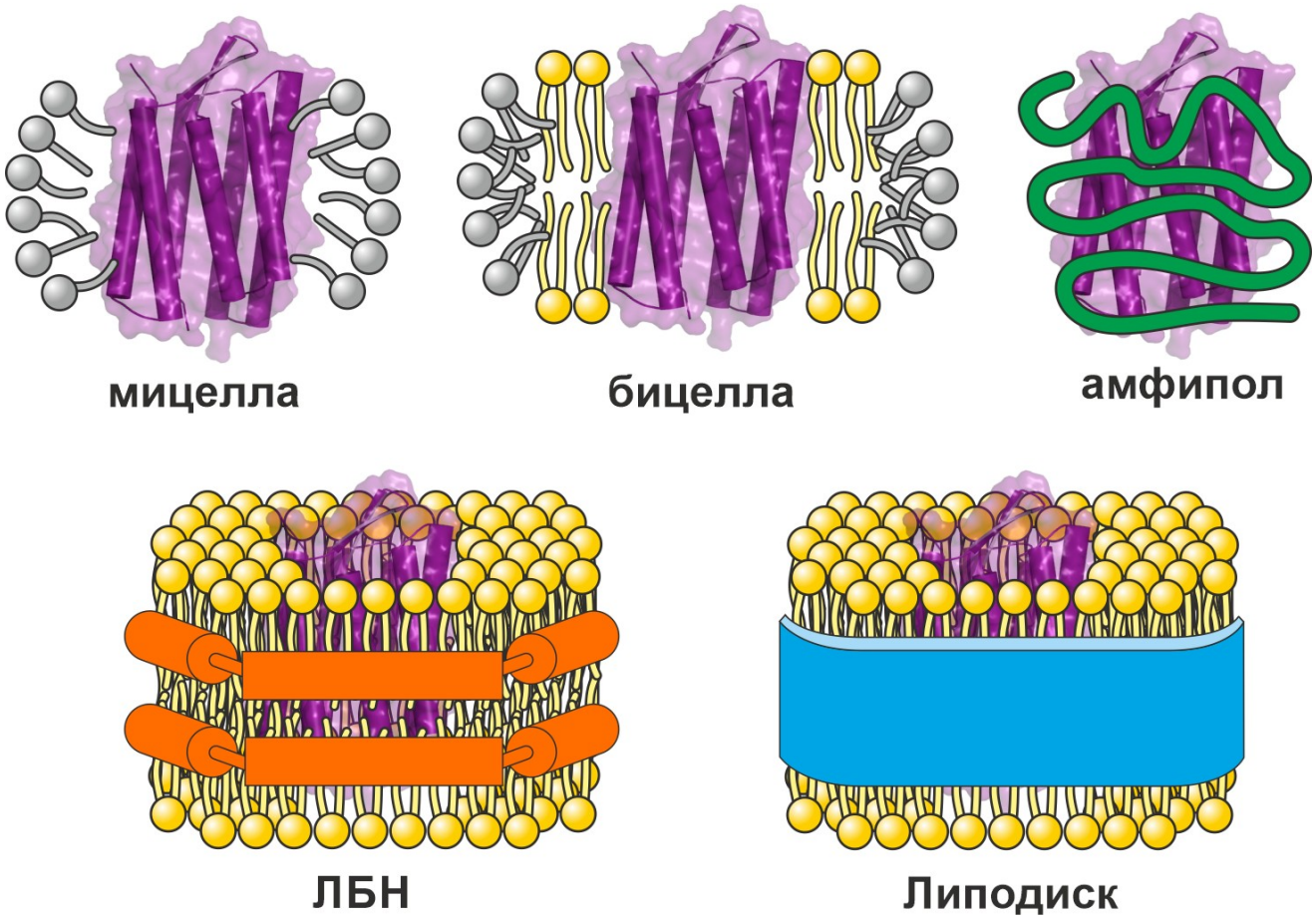

Рисунок 1. Схематическое изображение основных типов мембраноподобных сред, используемых в спектроскопии ЯМР высокого разрешения.

1.1.1. Органические растворители

МБ обычно нерастворимы в воде из-за присутствия больших гидрофобных регионов. Одна из стратегий экранирования неполярных частей белка от полярного растворителя - добавление до 100% органических растворителей, таких как метанол, этанол, изопропанол, трифторэтанол, хлороформ, ДМСО и пр. в чистом виде либо в смеси. В силу ряда факторов, органические растворители были первой мембраноподобной средой для ЯМР-спектроскопии. Во-первых, для большинства растворителей доступны их дейтерированные аналоги, а, во-вторых, растворители не формируют частиц в растворе, что существенно упрощает работу с ними, уменьшает размер объекта исследования и улучшает разрешение и чувствительность спектров. В качестве примера можно привести исследования фрагментов бактериородопсина в смеси хлороформ/метанол 1:1 в присутствии 0.1 M LiClO4 [11–13] или протон-транспортирующей субъединицы с F1F0 АТФ-синтазы в смеси хлороформ/метанол/вода 4:4:1 [14]. В то время как МБ обычно принимают правильную вторичную структуру в таких смесях, нативная третичная структура не образуется, из-за отсутствия выраженной границы между полярной и неполярной частями раствора. В результате, сегодня использование органических растворителей ограничено исследованиями вторичной структуры спиральных белков с одним или двумя ТМ участками [15,16] или небольших мембраноактивных пептидов [17,18].

1.1.2. Детергенты

Детергенты - исторически первая мембраноподобная среда для спектроскопии ЯМР высокого разрешения, которая действительно походит на клеточную мембрану. Одной из основных характеристик детергентов является критическая концентрация мицеллообразования (ККМ). При концентрациях ниже ККМ детергенты растворимы в воде в мономерной форме, в то время как выше ККМ выраженная амфифильность молекул детергентов приводит к образованию агрегатов - мицелл с гидрофобным "ядром" и гидрофильной поверхностью. В мицеллах присутствует чёткая граница между полярной и неполярной фазами, что заставляет фрагменты МБ взаимодействовать друг с другом внутри частицы и, таким образом, образовывать третичную структуру. Детергенты обычно подразделяют на "жёсткие" и "мягкие" [19]. Жёсткие детергенты чаще всего являются ионными и применяются для растворения телец включения бактерий или других осадков белковой природы, в то время как мягкие детергенты не заряжены, иногда несут углеводные группы и применяются для экстракции белков из клеточных мембран с сохранением их нативной структуры и активности. Параметры упаковки молекул липидов в частицах, а также кривизна поверхности мицелл достаточно далеки от характеристик бислойной липидной мембраны. Это может вызвать неправильную укладку МБ и

определённо является недостатком мембраноподобных сред на основе детергентов. С другой стороны, мицеллы характеризуются сравнительно небольшим размером (20-100 кДа), что чрезвычайно важно для ЯМР-спектроскопии в растворе. Кроме того, многие детергенты коммерчески доступны в дейтерированном виде. Как будет показано ниже, МБ могут сохранить свою нативную структуру в конкретном детергенте или смеси детергентов, благодаря чему мицеллы являются наиболее широко используемой мембраноподобной средой для ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. На заре развития методики ЯМР (в конце 80х - начале 90х годов XX века) МБ изучались в основном в жёстких детергентах, таких как додецил сульфат натрия (SDS) [13,20,21], даже сейчас многие работы проводятся именно в таком окружении [22–28]. Несмотря на широчайший выбор детергентов, только несколько из них используются при исследованиях структуры МБ и скрининге мембраноподобных сред методами ЯМР-спектроскопии в растворе (Рис. 2).

Сверхмягкие детергенты - децил- и додецилмальтозид (DM, DDM), которые применяют для экстракции белков из клеточных мембран в активной форме, обычно выбираются для изучения белков с семью ТМ сегментами, таких как бактериородопсин [29,30] и G-белок сопряжённые рецепторы (GPCR, [31–33]), а также других полиспиральных белков например, потенциалозависимых ионных каналов [34]. GPCR также активны в смесях DDM с холестерин гемисукцинатом (ХГС) [35,36]. Перечисленные среды действительно могут поддерживать нативную структуру многих белков, однако в них образуются мицеллы слишком большого размера (~70-100 кДа), что затрудняет получение качественных спектров ЯМР в таком окружении. В последнее время были предложены несколько новых мягких детергентов, не уступающих DM и DDM с точки зрения сохранения активности GPCR, а именно мальтозида неопентилгликоль (MNG) [37] и β-додецилмелибиозид (β-DDMe) [38]. MNG содержит две углеводородных цепочки и головную группу, образованную остатком дисахарида. Таким образом, MNG близок по структуре к молекуле стандартного фосфолипида. Было показано, что MNG на порядок продлевает время жизни образцов ряда GPCR и способен стабилизировать белки даже при температуре свыше 50 ºC. При этом, если первые предложенные варианты детергента (лаурил-3-MNG) образуют мицеллы слишком большого размера для ЯМР-спектросокпии в растворе (7.2 нм, более 200 кДа), то не так давно были предложены варианты MNG (например, октил-3-MNG), которые зачастую превосходят лауроил-3-MNG в отношении активности встроенных в мицеллы GPCR, и, при этом, образуют мицеллы радиусом 2.5-2.7 нм (30-40 кДа) [39]. В свою очередь, β-DDMe отличается от DDM исключительно остатком углевода: вместо мальтозы (4-O-α-D-глюкопиранозил-D-глюкоза) детергент содержит мелибиозу

(6-O-α-D-галактопиранозил-D-глюкоза). Несмотря на кажущуюся незначительность различия, β-DDMe образует мицеллы, которые на 30 кДа меньше мицелл DDM, при этом детергент позволяет получить на 40% более высокую активность диацилглицеринкиназы (DAGK). Более того, спектры ЯМР данного белка существенно лучшего качества в β-DDMe чем в DDM. При этом, стоит отметить, что ряд других мягких детергентов невозможно использовать в исследованиях при помощи ЯМР-спектроскопии в растворе. Так, спектры ЯМР приемлемого качества не были получены ни для одного белка в детергентах семейств Brij и Tween, а также Triton-X-100, хотя все три типа сред успешно применяются в биоорганической химии для экстракции МБ из клеточных мембран [40,41]. Аналогично, в литературе не удалось найти случаев успешного использования мицелл производных холиевой кислоты, таких как CHAPS и CHAPSO, для исследований методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения [40]. Итого, "мягкость" детергента не является очевидным критерием его применимости для ЯМР-спектроскопии. Более того, мягкие детергенты зачастую формируют мицеллы большого размера, а МБ в таком окружении испытывают дополнительную подвижность в мс-мкс диапазоне, что приводит к уширению сигналов и потере качества спектров ЯМР.

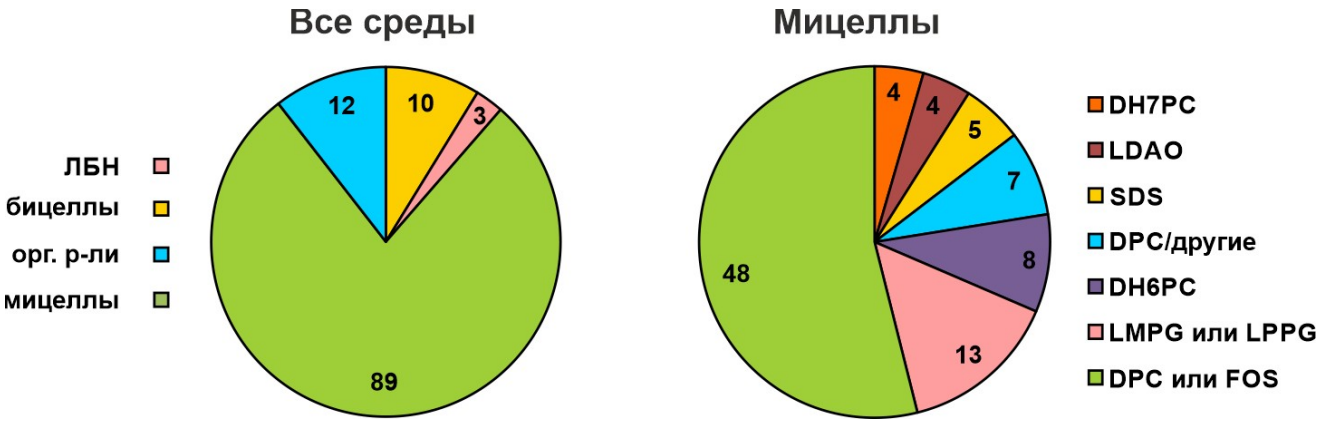

Рисунок 2. Мембраноподобные среды, используемые для определения пространственных структур белков методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. Показано количество структур белков в базе PDB, определённых в различных МПС с 2010 по 2017 годы. 114 структур были получены на веб-сайтах http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/ и http://www.drorlist.com/nmr/MPNMR.html, а также вручную найдены в базе данных PDB среди записей, аннотированных как “MEMBRANE PROTEIN” и не упомянутых на обоих сайтах. Левая гистограмма показывает распределение найденных структур среди основных типов МПС, голубой сектор соответствует органическим растворителям. Правая гистограмма описывает использование конкретных детергентов в мицеллах. FOS-10 (2 структуры), FOS-14 (1 структура) и FOS-30 (1 структура) посчитаны вместе с DPC. Голубой сектор соответствует смесям DPC с другим детергентом (SDS) или фосфолипидом.

Среди жёстких детергентов можно также выделить несколько наиболее широко используемых. Додецилфосфохолин (DPC) и лаурилметиламин-N-оксид (LDAO) формируют мицеллы малого размера (20-25 кДа), зачастую способны поддержать нативную структуру МБ и обеспечивают спектры ЯМР высокого качества [42–54]. Иногда используются нестандартные аналоги DPC с метилированной, гидроксилированной ацильной цепью или с изменённой длиной остатка жирной кислоты (FOS-30, FOS-10, FOS-14 и др.), которые демонстрируют повышенную по сравнению с DPC способность растворять и стабилизировать ТМ домены некоторых МБ [55–58]. Анионные лизолипиды (LMPG, LPPG) могут растворить МБ непосредственно из осадка реакционной смеси бесклеточной системы продукции, и, зачастую, используются в исследованиях при помощи ЯМР спектроскопии [40,59–61]. Однако, как было показано, такие детергенты могут вызывать неправильную укладку и инактивацию МБ [62,63]. Дополнительно, недавние работы показали перспективность короткоцепочечного липида дигептаноилфосфатидилхолина (DH_7PC), способного образовывать мицеллы эллипсоидной формы, в качестве МПС для различных МБ, в том α-спиральных [64–66]. Схожий липид, дигексаноилфосфатидилхолин (DHPC), также неоднократно применялся для изучения пространственной организации β-структурных белков внешней мембраны бактерий [67–70]. Часто, наилучшие результаты модно получить при использовании смешанных мицелл, в которых одновременно используются два и более типа детергентов с различной длиной жирных хвостов и/или различным зарядом головных групп [45,46,71–76]. Стоит отметить, что практически все жёсткие детергенты, используемые в ЯМР-спектроскопии МБ в настоящее время очень похожи на фосфолипиды и часто даже являются ими. Они содержат или одну длинную (10-14 атомов углерода) или две коротких (6-7 атомов углерода) ацильных цепи, а также головную группу стандартных фосфолипидов - либо фосфатидилхолин либо фосфатидилглицерин. Использование различных детергентов для определения пространственных структур МБ методами ЯМР высокого разрешения обобщено на Рис. 2, а свойства наиболее распространённых детергентов подробно описаны в обзорной статье [77].

1.1.3. Бицеллы

Бицеллы - частицы, образующиеся в смесях липидов с двумя ацильными цепями с некоторыми детергентами, являются одной из самых многообщеающих МПС для исследования МБ вообще и с использованием ЯМР в частности. Считается, что бицеллы содержат плоский участок липидного бислоя, окружённый ободом из молекул детергентов. Впервые спонтанное образование бицелл было описано в 1984 [4], и, с начала 1990х, они стали активно использоваться в качестве анизотропной среды для измерения остаточных констант диполь-

дипольного взаимодействия, из-за свойства больших бицелл спонтанно ориентироваться в сильном магнитном поле [78,79]. Эта же способность привела к широкому распространению бицелл в J-разрешенной ЯМР-спектроскопии твёрдого тела [80]. Следует сказать, что не любой детергент, если его смешать с липидами, будет образовывать бицеллы. На момент начала работы способность образовывать бицеллы была выявлена у DHPC и холиевой кислоты с ее аналогами - CHAPS и CHAPSO [4,78,79]. Раствор DMPC/DH_7PC неоднократно использовался в качестве МПС и назывался "бицеллами", однако форма и свойства частиц в такой смеси так и не были подтверждены экспериментально [81,82]. Размер частиц бицелл может варьироваться в широком диапазоне, начиная от 30-40 кДа, при изменении молярного соотношения липид/детергент, q. Бицеллы с q более двух называются анизотропными из-за своей способности к спонтанной ориентации в магнитном поле, при этом малые бицеллы никак не реагируют на внешнее магнитное поле и могут применяться в спектроскопии ЯМР в растворе, а также в крио-электронной микроскопии, и называются изотропными. Как размер, так и способность к ориентации бицелл может зависеть от температуры [83–86]. Изотропные бицеллы применяются в ЯМР-спектроскопии с середины 2000х годов, и с их помощью уже удалось получить пространственные структуры α-спиральных мембранных белков и ряда β-бочек, во многом благодаря методикам, разработанных автором [63,87–89].

Показано, что анизотропные бицеллы могут формироваться с участием различных липидов, в частности - фосфолипидов с ацильными цепями разной длины и степенью насыщенности, с разными головными группами, с добавлением холестерина, сфинголипидов и ганглиозидов [90–94], что делает бицеллы удобной средой для изучения влияния липидного окружения на структуру и физико-химические свойства МБ, а также для исследования специфических взаимодействий типа липид/белок. Наконец, для приготовления бицелл можно использовать экстракты мембран различных тканей или организмов, что позволяет с высокой точностью воспроизводить липидный состав мембран в искусственных системах [95]. Аналоги липидов с простыми эфирными связями вместо сложноэфирных могут применяться для приготовления бицелл, чтобы сделать их более устойчивыми к гидролизу при низких pH [96], а ободообразующие агенты можно полимеризовать, чтобы увеличить стабильность исследуемого МБ [97]. Несмотря на очевидное многообразие возможностей, до последнего времени для исследования структуры и свойств МБ при помощи ЯМР-спектроскопии в растворе использовался только один состав бицелл - смесь DMPC/DHPC с q в диапазоне 0.2-0.5, что связано в первую очередь с недостаточной изученностью альтернативных составов. Бицеллы состава DMPC/DHPC были исследованы достаточно тщательно. Для этой смеси были

предложены несколько различных моделей, описывающих зависимость размера частиц от соотношения q [84,98,99], из которых модель Triba и соавторов наилучшим образом соответствует экспериментальным данным. Размеры бицелл были изучены методами крио-электронной микроскопии, электронной микроскопии с негативным контрастом, малоуглового рассеяния нейтронов и и рентгеновских лучей, фотон-корреляционной спектроскопии и ЯМР-спектроскопии, что позволило описать сложные фазовые диаграммы системы DMPC/DHPC [83,84,86,100–105]. Тем не менее, большая часть данных относится к поведению частиц большого размера, неприемлемого для ЯМР-спектроскопии в растворе. Несмотря на несколько недавних работ, наблюдается недостаток информации о поведении малых бицелл, особенно изотропных бицелл нестандартного состава. Из литературы известны следующие факты: (1) Бицеллы DMPC/DHPC с q=0.5 имеют гидрадинамический радиус 3.0-4.5 нм [86], (2) по данным спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО), в ближайшей окрестности белка находятся в первую очередь молекулы липида [89], (3) бицеллы DMPC/DHPC увеличиваются при разбавлении из-за того, что детергент может находится в растворе в мономерной форме [105], (4) по данным компьютерных экспериментов при помощи молекулярной динамики в укрупненном силовом поле (МД) малые бицеллы DMPC/DHPC не образуются *in silico* [105], (5) размер бицелл странным образом зависит от температуры [86], (6) фазовые переходы в бицеллах наблюдаются, но не для частиц того размера, который обычно применяется в исследованиях методами ЯМР-спектроскопии в растворе [105]. Этого объема данных очевидно недостаточно для рационального использования бицелл в качестве мембраноподобных сред.

Можно сформулировать существующие вопросы более конкретно. Во-первых, на момент начала работы было совершенно непонятно, содержат ли на самом деле бицеллы участок липидного бислоя. Существовало несколько аргументов как в пользу, так и против данного предположения. Например, ряд измерений показал, что размер частиц малых бицелл не соответствует теоретической оценке [105], эксперименты по переносу насыщения в спектрах ЯМР демонстрируют возможность контакта между молекулами детергента и ТМ доменом в бицеллах [106], параметры фазовых переходов липидов в бицеллах отличаются от таковых в бислоях, а для малых бицелл, применяемых обычно в ЯМР-спектроскопии, фазовые переходы в принципе наблюдать не удавалось [105], наконец, в МД-симуляциях изотропные бицеллы не формируются [105]. С другой стороны, спектры ЯЭО показывают отсутствие взаимодействий между ТМ белком и детергентом [89], а большинство аргументов против наличия в бицеллах липидного бислоя можно объяснить определёнными неточностями или ошибками экспериментов и используемых моделей. Во-вторых практически ничего не было известно о

форме и размере бицелл, образованных в смесях различных фосфолипидов и детергентов. Начиная работу, любой исследователь желал бы знать, как размер бицелл зависит от q, какой в конкретных условиях будет диаметр участка липидного бислоя, какая будет подвижность частицы, поперечная релаксация ядер молекулы МБ, в неё встроенного. В-третьих, в принципе не было методики оценки различных смесей липид/детергент в отношении их способности формировать бицеллы. Непонятно, какие липиды и/или детергенты можно использовать для приготовления бицелл, а какие - нежелательно. Решение перечисленных вопросов являлось одной из задач представленной работы.

Преимущества бицелл перед мицеллами очевидны - они, скорее всего, содержат участок липидного бислоя, могут воспроизводить липидный состав клеточной мембраны и поддерживать активность и нативную структуру многих МБ [82,107]. Тем не менее, применение бицелл в ЯМР-спектроскопии высокого разрешения ограничено - в данной среде получены или охарактеризованы структуры одного β-бочонка [89], нескольких двухспиральных белков [76,87,108], ArfGTP [88], комплекса двух субъединиц цитохрома P450 [109], а также малого транспортёра Smr [107]. Не так давно бицеллы были успешно применены для реконструкции и определения структуры тримера белка вируса ВИЧ Env, а также ТМД рецепторов FAS и DR5 [110–112]. В целом, всего лишь 10% структур МБ, полученных с использованием ЯМР, были определены в окружении бицелл. Причиной слабой распространённости бицелл могут являться относительно большой минимально допустимый размер бицелл, а также сложности с переносом объекта исследования из детергента, который изначально был применён экстракции МБ из клеточной мембраны или для солюбилизации белка из телец включения бактерий или осадка реакционной смеси бесклеточной системы продукции.

1.1.4. Липид-белковые нанодиски

Липид-белковые нанодиски (ЛБН), подобно бицеллам, являются МПС с высокой степенью сходства с клеточной мембраной. ЛБН также содержат участок липидного бислоя, окруженный "поясом" из специальных белков. Для формирования ЛБН были предложены несколько различных белков, наиболее распространённые варианты созданы на основе так называемого белка мембранного скаффолда (MSP), который является частью аполипопротеина A-I [113–115]. В свою очередь, аполипопротеин A-I используется в человеческом организме для формирования частиц липопротеина высокой плотности. MSP состоит из амфифильных α-спиралей, при этом неполярная часть спиралей экранирует гидрофобные ацильные цепи липидов от водного окружения. Радиус "классических" ЛБН, сформированных белком MSP1 составляет около 5 нм [116,117], хотя недавно были разработаны укороченные версии белка

MSP1 с удалёнными фрагментами спиралей, что позволило уменьшить размер частиц ЛБН до 3.5-4.0 нм [42]. MSP1 можно с определённой условностью разделить на 10 α-спиралей, называемых H1-H10, а укороченные версии MSP1 получены удалением одной или нескольких спиралей H4, H5 и H6. Для исследований МБ большого размера были разработаны удлинённые варианты "поясного" белка, полученные удвоением последовательности белка MSP [118]. Обычно ЛБН характеризуются определённой степенью полидисперсности раствора и относительно невысокой стабильностью. Чтобы преодолеть указанные недостатки было предложено использовать систему на основе сортилин/сортазы, чтобы циклизовать MSP и получить версию ЛБН, где "поясной" белок стабилизирован ковалентной сшивкой между N- и C-концами [119]. Такая манипуляция позволяет получить сверхстабильные монодисперсные растворы ЛБН. Напротив, использование короткого фрагмента MSP1 длиной в 36 остатков (NSP), позволяет получить нанодиски, размер которых варьируется в зависимости от размера встроенного в них белка, а так же от соотношения между концентрацией липида и NSP [120,121]. Так, можно получить образцы белка MALFGK2 массой 250 кДа, размеры которого существенно превышают размер участка липидного бислоя в ЛБН на основе MSP1. Наконец, помимо нанодисков на основе "поясного" белка, были предложены нанодиски на основе кольцевой ДНК [122]. Такие ДНК-диски характеризуются большим размером (радиус более 22 нм) и неприменимы для ЯМР, однако оказались удобной средой для исследования физико-химических свойств МБ. Параметры ЛБН различных типов обобщены в таблице 1.

Таблица 1. Параметры ЛБН на основе различных поясных белков

поясной белок	**диаметр, нм**	**число молекул липидов**	**масса, кДа**
MSP1D1	9.5	160	124
MSP1D1ΔH5	8.2	100	95
MSP1D1ΔH4	7.8	90	93
MSP1D1ΔH4ΔH5	6.9	40	70
SapA pH 4.8	-	42	37
SapA pH 7.4	-	180	84
NSPr	зависит от соотношения	зависит от соотношения	зависит от соотношения
22A	зависит от соотношения	зависит от соотношения	зависит от соотношения

ЛБН претерпевают фазовый переход при температурах, близких к критическим температурам липидного бислоя соответствующих составов [116,117]. При этом, упаковка липидов в ЛБН отличается от таковой в липосомах, как следует из параметров подвижности ацильных цепей [123,124]. Иными словами, состояние липидов в ЛБН скорее всего отличается от жидко-кристаллической фазы липидного бислоя. Основными преимуществами ЛБН являются их относительно высокая монодисперсность, устойчивость к агрегации встроенных в них МБ, возможность варьирования липидного состава для имитации нативной клеточной мембраны [125]. В литературе можно встретить упоминания об успешной сборке ЛБН с участием практически любых возможных липидов, самыми популярными вариантами является DMPC, POPC, DMPG, а также фосфатидилэтаноламины (PE), и фосфатидилинозитолтрифосфат (PIP) [126]. Перечисленные выше свойства ЛБН позволяют поддерживать стабильность объекта исследования и достигать его высоких концентраций, необходимых для структурных исследований методом ЯМР. По сравнению с бицеллами, ЛБН характеризуются отсутствием детергентов, дискретным набором возможных размеров частиц, и запретом на обмен веществом между частицами. Это препятствует олигомеризации белков, но делает невозможным исследования взаимодействия между МБ в составе ЛБН.

Впервые возможность получения нанодисков была показана в 2002 году, а уже в 2007 были опубликованы статьи, подтверждающие применимость ЛБН в качестве мембранного окружения для исследования пространственных структур МБ методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения [127]. В ранних работах ЛБН использовались для определения положения мембраноактивных пептидов на поверхности липидного бислоя [127–129]. Для антимикробного пептида антиамёбина с использованием спиновых меток удалось получить информацию об ориентации относительно поверхности мембраны и заглубленности в бислой [127], при этом качество спектров ЯМР пептида было относительно высоким, подтверждая принципиальную возможность исследования МБ большего размера. В последующих публикациях было предложено использовать ЛБН в качестве точки отсчёта при поиске оптимального детергента для структурных исследований α-спиральных МБ [62,82,130–132]. Следует упомянуть, что эти пионерские работы в области применения ЛБН для спектроскопии ЯМР были выполнены в лаборатории Биомолекулярной ЯМР спектроскопии ИБХ РАН в 2004-2006 годах. Впоследствии, возможность получения пространственных структур МБ в окружении ЛБН была продемонстрирована на крупных белках - канале VDAC-1 [133] и рецепторе CD4 [134], а внедрение малых ЛБН позволило действительно определить пространственные структуры двух

β-бочонков [135,136]. Более того, в 2017 году удалось установить структуру MSP в составе ЛБН [137], а также изучить динамические характеристики молекул липидов в ЛБН различного состава [138,139], в 2018 году в составе ЛБН была исследована pH-зависимая активация канала KcsA [140]. ЛБН успешно применялись и в других областях структурной биологии. В качестве среды для кристаллизации белков ЛБН не показали каких-либо выдающихся свойств. С другой стороны, высокая степень однороности препаратов ЛБН позволяет получать структуры МБ высокого разрешения с использованием электронной микроскопии (ЭМ). При помощи крио-ЭМ в составе ЛБН были получены структуры высокого разрешения (3-4А) рианодинового рецептора, а также рецептора TRPV1 в различных состояниях (в апо форме, комплексе с лигандами) [141,142]. Нанодиски использовались в ЭМ-исследованиях липоксигеназы, магниевых каналов, АМФ-зависимой киназы и других мембранных белков [143–146]. Наконец, ЛБН активно используются при изучении белок-белковых взаимодействий с использованием индуктивно-резонансного переноса энергии флюоресценции на уровне одиночных молекул (FRET) [147].

Несмотря на очевидные преимущества, ЛБН имеют ряд значительных недостатков, которые ограничивают их широкое применение в работах с использованием ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. ЛБН достаточно дороги - для их сборки требуется получить рекомбинантный белок MSP, а также сложны в приготовлении. Размер даже самых небольших ЛБН оказывается не менее 50-60 кДа, что все ещё слишком много для стандартных методов ЯМР-спектроскопии. Спектры МБ в составе ЛБН часто характеризуются чрезвычайно низким качеством. Для проведения исследования пространственной структуры МБ в ЛБН, объект исследования необходимо дейтерировать, а также специфически пометить ^{13}C по метильным группам, что усложняет протоколы продукции МБ и увеличивает стоимость образцов.

1.1.5. Липодиски

Еще одним вариантом МПС, содержащей участок липидного бислоя, являются липодиски, в англоязычной литературе называемые SMALP (styrene maleic acid copolymer lipid protein particle, англ.). Многие исследователи называют данный тип МПС "полимерными нанодисками". Структура липодисков схожа со структурой ЛБН - участок липидного бислоя окружен ободом из сополимера малеиновой кислоты и стирола (SMA). SMA является амфифильной молекулой, которая способна образовывать относительно небольшие дисковидные частицы напрямую из липидных везикул, в отличие от MSP, который необходимо применять в сочетании с детергентами. В липодиски удалось встроить такие белки как бактериородопсин, β-бочонок липид А пальмитоилтрансферазу PagP и модулятор потенциалозависимого калиевого канала KCNE1 [148–150]. SMA можно получать с различным соотношением стирола и малеиновой кислоты (2:1, 3:1, 4:1), при этом изменяются свойства получаемых частиц [151]. Работы с использованием калориметрии показали, что параметры фазовых переходов в липодисках на основе SMA существенно отличаются от наблюдаемых в липидных везикулах [152,153]. Критическая температура существенно снижается, а сам переход становится значительно шире, при этом поведение частиц, образованных SMA 2:1 ближе к поведению липидного бислоя в липосомах. Для создания липодисков были предложены другие варианты амфифильных полимеров, например заряженные версии SMA, которые лучше подходят для исследования взаимодействия белков с мембраной [154] или DIBMA - сополимер малеиновой кислоты и диизобутилена [155]. В отличие от SMA, DIBMA не несет ароматических групп, гораздо слабее нарушает упаковку липидов в бислое и может применяться в работах с использованием УФ-спектроскопии. Согласно последним публикациям, МБ могут сохранять стабильность и функциональность в составе липодисков [156]. Частица липодиска со встроенным в нее семиспиральным МБ имеет диаметр около 11 нм (сопоставимо с диаметром ЛБН на основе MSP1), но содержит всего лишь 11 молекул липидов, что несомненно недостаточно для создания липидного окружения, аналогичного нативному [157]. Это связано с большим объемом цепи SMA в составе SMALP, существенно превышающим долю белка MSP в составе ЛБН. С другой стороны, было показано, что размер SMALP может контролироваться изменением соотношения между стиролом и малеиновой кислотой, что позволяет получать частицы, содержащие большее число молекул липидов [151]. Одним из наиболее выдающихся свойств SMALP является способность SMA солюбилизировать МБ напрямую из липидных везикул или мембран клеток, без использования каких-либо детергентов, что увеличивает шансы получить стабильные образцы активного и нативно свёрнутого белка [158]. К тому же

SMA дешевле в производстве, чем поясные белки для ЛБН. С другой стороны, SMALP имеют очевидные недостатки - размер частиц слишком велик, а число молекул липидов в них слишком мало. По неизвестным причинам, в литературе нет данных об использовании SMALP для ЯМР-спектроскопии высокого разрешения, очевидно, возможность применения данного типа МПС будет изучена в самое ближайшее время.

1.1.6. Полимеры

Из перечисленных классов МПС сильно выделяеются среды на основе амфифильных полимеров, так называемые "амфиполы". Данный тип МПС отличает отсутствие в составе частиц МПС липидов или детергентов. Амфиполы - разветвлённые полимеры, обычно на основе полиакрилата, при этом часть карбоксильных групп модифицированы длинным линейным алкиламином (C8), часть - коротким разветвленным алкиламином, а часть оставлены неизменными. Цепи амфиполов формируют "оболочку" вокруг МБ, экранируя его неполярные части от растворителя, толщина оболочки составляет 1.5-2.0 нм [159–161]. На настоящий момент в окружении амфиполов с использованием ЯМР-спектроскопии были охарактеризованы пять МБ, как α-спиральных, так и β-структурных [8,162–169]. Перечисленные работы показали, что некоторые виды амфиполов способны поддерживать нативную структуру и активность МБ, и, при этом, позволяют получать спектры ЯМР высокого разрешения для их ТМ доменов, качество спектров может быть сопоставимо с получаемым в бицеллах или даже мицеллах детергентов. Некоторые амфиполы можно приобрести в дейтерированной форме, что также является важным преимуществом для исследований с использованием ЯМР высокого разрешения в растворе.

С другой стороны амфиполы не могут *a priori* считаться корректными миметиками липидного бислоя, в силу своей неестественной структуры. Следовательно, релевантность пространственных структур МБ, полученных в присутствии амфиполов всегда будет под вопросом, в том случае, если невозможно измерить активность белка или как-то по-другому подтвердить нативность его конформации. С другой стороны, все то же самое относится и к мицеллам, в которых получено более 80% структур мембранных белков, определённых методами ЯМР-спектроскопии. Стоит также отметить, что частицы МБ/амфипол не монодисперсны, поэтому необходимо выделить фракцию образца для получения спектра высокого качества, что понижает эффективность гетерологической продукции белка [8]. Наконец, амфиполы не являются универсальным решением для любого случайно выбранного МБ, в литературе встречаются примеры их неудачного применения в отношении нескольких объектов [8], когда МБ не удавалось ресолюбилизировать в амфиполах или не удавалось

получить спектры ЯМР качества, достаточного для проведения исследования. Таким образом, амфиполы можно рассматривать как альтернативу бицеллам или ЛБН, когда МБ склонны к агрегации.

1.1.7. Методы солюбилизации мембранных белков в мембраноподобных средах

Несмотря на широкий круг МПС, существует не так много подходов для солюбилизации МБ. При наиболее удачном стечении обстоятельств, осадок белка, полученный после процедуры переосаждения или при продукции в бесклеточной системе, может быть солюбилизирован непосредственно водным раствором МПС - мицеллами или бицеллами [59]. Если α-спиральный мембранный домен растворим в органических растворителях, таких как смеси трифторэтанол/вода или гексафторизопропанол/вода, липиды или детергенты можно добавить к такому раствору в виде сухого порошка. Затем в смеси увеличивают содержание воды до 50-70%, когда в растворе начинают образовываться частицы и лиофильно высушивают после заморозки в жидком азоте, после чего растворяют полученный порошок в воде [45]. Данный подход может применяться только в отношении наиболее простых объектов, таких как односпиральные ТМ домены битопных МБ. Более сложные α-спиральные МБ могут подвергаться процедуре ренатурации: белок в виде осадка растворяется в жёстком детергенте (например, SDS), после чего производят замену окружения либо в процессе афинной хроматографии с заменой детергента на бицеллы, либо добавлением липида/амфипола и диализом (при этом можно получить ЛБН, липодиски или липосомы) [170]. Помимо диализа для удаления детергента могут использоваться специальные смолы, поглощающие амфифильные молекулы, например, Biobeads [149,171]. Альтернативно, детергенты с высокой ККМ можно заменить на слабо растворимые детергенты с использованием полупроницаемых мембран и процедуры многократного разбавления/концентрирования [172].

Стоит отметить, что процедура ренатурации применима к очень ограниченному кругу объектов. Поэтому, большинство МБ пытаются получить непосредственно в "растворимом виде" - в мембранной фракции культуры клеток. Такие МБ можно экстрагировать с использованием мягких детергентов - DDM, LMNG и затем очистить и перевести в нужную мембраноподобную среду с использованием афинной хроматографии, концентрирования на полупроницаемых мембранах или диализа [31,173,174]. Именно так были получены образцы нескольких GPCR [35,36,175].

1.1.8. Рациональные подходы к выбору мембраноподобного окружения

Разнообразие МПС, имеющихся в распоряжении современного учёного приводит к возникновению одной из важнейших проблем структурной биологии МБ - проблемы корректного и рационального выбора МПС для исследуемого белка. В первое десятилетие применения ЯМР-спектроскопии для исследований структуры белков изотопное мечение и гетерологическая продукция белков были достаточно дороги, поэтому, все работы с МБ проводились в смесях органических растворителей или в единственном дешёвом детергенте, который был доступен в дейтерированной форме - SDS. Это относится и к первой полученной при помощи ЯМР структуре МБ - грамицидина А [20]. Учёные того времени не проводили скринингов детергентов и не тестировали активность МБ, они использовали единственный вариант модельной среды, который у них был, не обращая внимания на возможно ненативный характер окружения. С другой стороны, сейчас, когда изотопное мечение является рутинной задачей, необходимо сформулировать критерии выбора мембраноподобной среды из широкого круга различных вариантов. Можно предложить простое решение - выбирать окружение, которое сильнее всего напоминает бислойную мембрану, например, ЛБН или бицеллы. Однако, на этом пути есть несколько сложностей. Во-первых, использование ЛБН или бицелл не всегда приводят к правильной структуре МБ. Во-вторых, и бицеллы и ЛБН характеризуются сравнительно большим размером частиц в растворе, что не позволяет осуществлять непосредственно определение пространственной структуры. В больших частицах, сигналы в спектрах ЯМР не могут быть отнесены с использованием экспериментов тройного резонанса, и для получения отнесения необходимо использовать чрезвычайно дорогой подход точечного сканирующего мутагенеза [31]. Кроме того, поскольку исследования больших объектов требуют дейтерирования боковых цепей белка, пространственная структура МБ в изотропных бицеллах и ЛБН не может быть разрешена при помощи стандартных подходов на основе ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО), требуется применение малочувствительных четырехмерных спектров [44], спиновых зондов [59,64] и остаточных дипольных констант в анизотропном окружении [176,177]. Следовательно, МПС с большим размером частиц - ЛБН, большие бицеллы, липодиски и амфиполы являются "оружием последнего шанса" и применяются в исследованиях структуры МБ в тех случаях, когда другие среды не могут обеспечить стабильность, активность и нативную конформацию МБ. При любом стечении обстоятельств, гораздо удобнее работать в мицеллах или очень малых бицеллах (которые не содержат значительного количества липидов), чтобы минимизировать расходы как времени, так и денег.

Ниже будут перечислены возможные походы для выбора лучшего детергента для исследования структуры МБ.

Наиболее простым способом скрининга МПС является мониторинг активности целевого МБ. Это осуществимо для фотоактивных белков, таких как бактериородопсин, оптический родопсин и других подобных МБ, с использованием спектрофотометрии [30,33,159,172]. Функциональность GPCR можно оценивать на основе их способности связывать лиганды и G-белок в модельном окружении [31,32]. Активное состояние калиевого канала KcsA в мицеллах SDS было подтверждено при помощи гель-электрофореза, который показал преимущественное наличие тетрамерной формы белка в растворе [22]. Однако, приведённые примеры можно рассматривать скорее как исключение, а не как правило. Активность большинства других МБ невозможно определить простым способом. Мембранные белки I типа, такие как рецепторные тирозин киназы, работают только в виде полноразмерных белков, которые слишком велики для исследования методами ЯМР высокого разрешения. Проводимость ионных каналов также не может быть измерена ни в одной из МПС, пригодных для ЯМР в растворе. Более того, отсутствие связывания с лигандом или иной активности МБ не всегда однозначно свидетельствует о неправильной структуре белка. Могут происходить небольшие изменения в структуре, которые не влияют на общую укладку, но препятствуют связыванию с лигандом. Поэтому, необходимо предложить другие критерии для выбора МПС, помимо активности целевого белка.

Наиболее целесообразным способом оценки корректности укладки МБ является получение этой информации напрямую из спектров ЯМР. Такой подход применяется в подавляющем большинстве работ по поиску адекватных МПС. Первые обширные скрининги детергентов опирались на так называемое "качество" спектров ЯМР. Например, группа проф. Girvin провела чрезвычайно широкий скрининг условий для трех спиральных МБ в 2004 году, используя десятки различных детергентов [40]. За меру "качества" авторы взяли количество наблюдаемых сигналов в спектрах и время жизни образца. Стабильность образцов в течение длительного времени необходима, чтобы провести продолжительные эксперименты ЯМР (стандартное время накопления трехмерного спектра составляет два-четыре дня), в то время как число сигналов описывает общую подвижность белка, а также определяет принципиальную возможность исследования белка в данном окружении. На основании указанных критериев авторы обнаружили, что анионные лизофосфолипиды, такие как LPPG, оказались оптимальной средой для всех трех объектов. С другой стороны, хорошие спектры ЯМР с узкими кросс-пиками в большом количестве и длительное время жизни образца означают, что белок не

выпадает в осадок в данной МПС и не подвержен медленным конформационным переходам в диапазоне мкс-мс, но ничего не говорят об укладке МБ. В более поздней работе Girvin с соавторами обнаружили, что Smr, для которого ранее также был выбран LPPG в качестве оптимальной МПС, взаимодействует с лигандом только в бицеллах DMPC/DHPC [107]. Поэтому, необходимо дополнительно оценивать и дисперсию сигналов в спектрах ЯМР, особенно для спиральных МБ. Если укладка белка неверна и α-спирали не находятся в плотном контакте, дисперсия сигналов оказывается невысокой, в то время как в случае плотной упаковки с образованием специфических взаимодействий между ТМ сегментами, должны появляться отдельно стоящие пики. Такой критерий использовался коллективом под руководством проф. Wuthrich в обширном скрининге мембраноподобных сред для белка OmpX [55]. Дополнительно, полезность использования дисперсии сигналов в качестве критерия корректности окружения была показана на примере потенциалочувствительного домена калиевого канала KvAp [46]. В то время как в анионных фосфолипидах были получены хорошие спектры, правильная укладка домена наблюдалась исключительно в цвитерионном детергенте DPC и смеси DPC/LDAO, где "качество" спектров было ниже, а дисперсия сигналов, наоборот, существенно выше.

Тем не менее, даже высокая дисперсия сигналов в спектрах ЯМР не гарантирует того, что МБ принимает правильную укладку. Недавно, с внедрением ЛБН, стало возможным измерять спектры ЯМР в наиболее нативном окружении, внутри мембраны ЛБН, и выбирать МПС на основе мицелл или бицелл, опираясь на сходство спектров, полученных в ЛБН и в средах с малым размером частиц. Такой подход был впервые предложен проф. Шенкаревым с соавторами в 2010 г. для потенциалочувствительного домена канала KvAp, и с тех пор активно используется при скрининге детергентов [62].

Все вышеперечисленные методы опираются на скрининг - случайный перебор МПС, в то время как было бы чрезвычайно полезно рационально выбирать МПС под конкретный МБ. Чтобы это было возможным, необходимо чётко понимать, каковы параметры МПС, и как эти параметры влияют на качество спектров ЯМР и укладку исследуемого МБ. Работа Columbus с соавторами показала, что гидрофобная толщина частицы МПС является одной из основных детерминант структуры МБ и его поведения [72]. Авторы использовали детергенты разной природы и с различным зарядом головных групп для солюбилизации модельного двухспирального белка, TM0026. Им удалось показать, что внешний вид спектров ЯМР зависел в первую очередь от эффективной гидрофобной длины ацильных цепей детергента. Смеси двух различных детергентов позволяли получить спектры, идентичные зарегистрированным в другом детергенте с гидрофобной длиной ацильных цепей равной усреднённой длине для

смешиваемых компонентов. Таким образом, вместо обширного скрининга, можно выбрать детергент с короткими неполярными цепями и затем титровать полученный раствор детергентом с длинной цепью до достижения лучшего качества спектров ЯМР. Подобный принцип был применён при исследовании митохондриального белка BniP3: первоначальный образец в DPC титровали фосфолипидом с длинными ацильными цепями, DPPC, что позволило избавиться от нежелательной минорной структурной формы белка [45]. Смеси детергентов различной длины (LMPG/DH_7PC) использовались и для поиска наилучших условий регистрации спектров ЯМР для бактериального белка YgaP [73,74,130]. Помимо длины гидрофобных цепей, заряд головных групп также является важным параметром МПС. Для многих МБ, максимальная активность может быть достигнута только в неионных детергентах, таких как DM, DDM, LMNG [30,31,172], в то время как в некоторых случаях добавка заряженных молекул к цвиттерионным мицеллам может существенно улучшить стабильность образцов и качество спектров ЯМР. В частности, добавление небольших количеств анионного ПАВ SDS к мицеллам DPC существенно улучшило качество спектров ТМ домена FGFR3 [71], димера белка zz [75], комплекса DAP12 [76]. Более того, смесь катионного LDAO с DPC позволила получить наилучшее качество спектров ЯМР и корректную укладку вольт-сенсорного домена канала KvAp [46]. Также стоит иметь в виду общую конценрацию липидов и соотношение липид/белок. При низких значениях соотношения МБ могут ассоциировать и образовывать олигомеры, что приводит к уширению сигналов, появлению дополнительных наборов сигналов, общему ухудшению вида спектров ЯМР [178]. С другой стороны, при высокой концентрации молекул МПС происходит замедление вращательной диффузии, что также влечёт за собой потерю чувствительности и уширение сигналов в спектрах [178]. Следовательно, необходимо поддерживать разумное равновесие между концентрацией детергентов/липидов и белков. Размер ЛБН и бицелл также является важным параметром, подлежащим оптимизации. Частицы большого размера характеризуются медленной вращательной диффузией и быстрой поперечной релаксацией, в то время как в малых частицах число липидов может оказаться недостаточным, чтобы окружить МБ, что приводит к взаимодействию между белком и "ободом" частиц МПС. Это, в свою очередь, соответствует неоднородному окружению белка, и приводит к ухудшению качества спектров [42]. С учётом всего сказанного выше, очевидно, рациональный выбор и "тонкая настройка" мембраноподобных сред - это не мечта и может осуществляться даже при текущем уровне знаний о свойствах МБ и липидов. Все возможные подходы и критерии выбора МПС для исследуемого МБ показаны на рисунке 3.

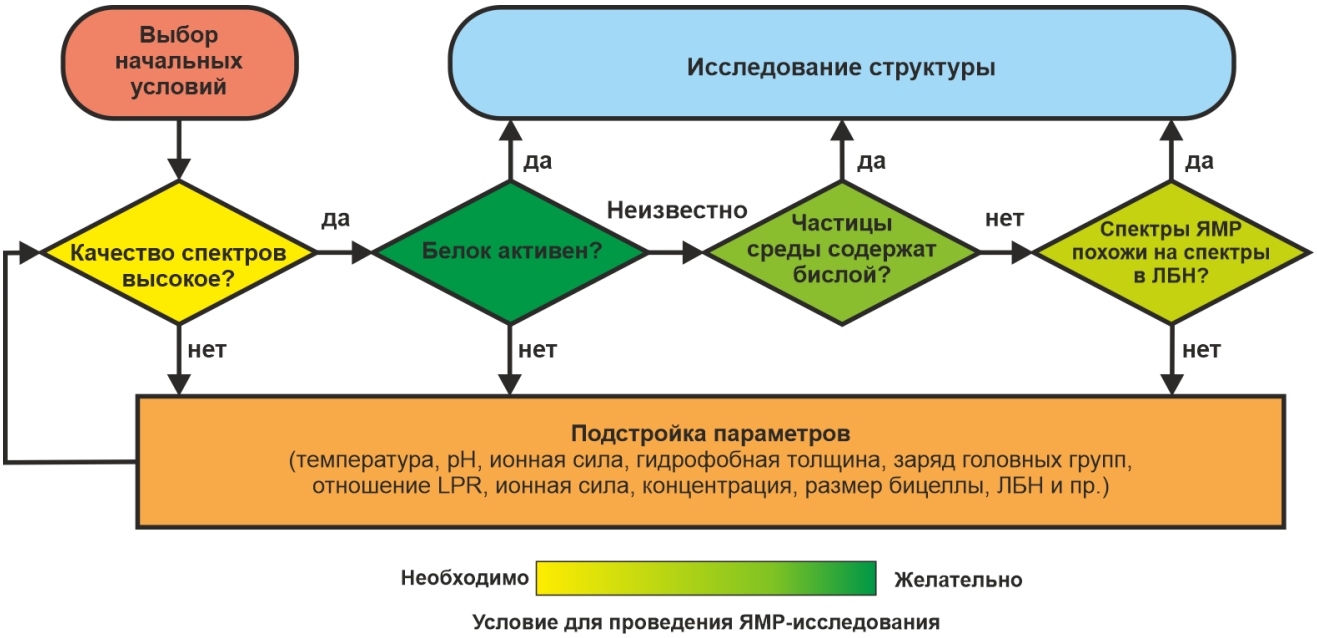

Рисунок 3. Алгоритм поиска МПС для исследования МБ при помощи ЯМР-спектроскопии в растворе.

1.1.9. Влияние окружения на структуру мембранных белков.

Для того, чтобы понять биологический смысл данных и интерпретировать результаты, полученные при помощи спектроскопии ЯМР высокого разрешения, необходимо выяснить принципы влияния мембраноподобного окружения на структуру, динамическое поведение и активность МБ. Сейчас каждая вторая публикация структуры МБ, определённой при помощи ЯМР в частицах МПС, наталкивается на критику рецензентов, направленную на "модельный" и "ненативный" характер окружения. Структуры МБ, определённые методом рентгеноструктурного анализа (РСА) рассматривается в качестве эталона и, как считают многие, описывают реальное состояние дел в мембране клеток. Также, структуры, полученные в мицеллах, считаются менее значимыми, чем структуры того же белка, полученные в окружении частиц ЛБН или бицелл. Однако, оба утверждения неверны. Следует отметить, что все доступные на сегодняшний день пространственные структуры МБ определены в модельном окружении - мицеллах, бицеллах, ЛБН, кристаллах в случае РСА, липосомах - в случае ЯМР твердого тела. Все перечисленные варианты окружения достаточно далеки от клеточной мембраны, что особенно очевидно в случае кристаллов, которые содержат чрезвычайно малые количества липидов. Следует понимать, что характеристики окружения каждого конкретного МБ в точности не известны. Можно найти множество данных о липидном составе внешнего и внутреннего слоя клеточных мембран различных типов [10], но уже довольно давно известно,

что мембрана имеет мозаичную структуру [179] и содержит множество микродоменов с особой, жидкоупорядоченной, фазой липидного бислоя. В литературе подобные микродомены называют также липидными рафтами. Многие МБ проявляют активность именно в рафтах, в ряде случаев миграция белка между жидкой мембраной и упорядоченными доменами может быть важной частью механизма активации [180]. Микродомены обычно толще, чем жидкая часть мембраны, имеют особый состав, богатый сфинголипидами и холестерином [181]. Окружение мембранного микродомена до сих пор не удавалось воспроизвести в МПС с частицами малого размера, более того, его вряд ли можно адекватно моделировать в липосомах. С другой стороны, клеточные мембраны богаты поверхностно-связанными периферическими белками, которые могут нарушать структуру липидного бислоя. К тому же, интегральные МБ влияют на окружающие их липиды: они могут специфически связывать молекулы липидов, а также изменять толщину бислоя и упаковку липидов в мембране [182,183]. Таким образом, использование различных МПС может моделировать различные состояния клеточной мембраны и позволяет получить различные функциональные состояния МБ (т.е. активное, неактивное, переходное состояние фолдинга и и др.). Считается, что мицеллы способны подстраивать свою форму под исследуемый белок, и во многих случаях могут предоставить МБ более нативное окружение, чем бислой-содержащие частицы, поскольку выбор липида с неправильной длиной жирных цепей в бицеллах или ЛБН может подействовать на структуру белка. Возможность подобных ошибок была отлично проиллюстрирована на примере недавнего исследования белка M2 вируса гриппа, который принимал различные конформации, в зависимости от толщины и заряда липидного бислоя [184]. Важно понимать, какой тип искажений детергенты могут вносить в пространственную структуру исследуемого МБ, чтобы использовать мицеллы с необходимой осторожностью и быть уверенным в нативном состоянии белка в таком окружении. Несколько недавних работ проливают свет на влияние выбора МПС и кристаллизации на пространственную структуру различных белков. Эти работы помогут понять влияние среды на структуру МБ и судить о значимости получаемых пространственных структур.

Наиболее ярко эффект детергентов проявляется в случае периферических мембранных белков, примембранных регионов и водорастворимых доменов МБ. Мембраноактивный белок оболочки вируса HIV-1 образовывал искривлённую спираль на поверхности мицелл DHPC и прямую идеальную α-спираль в бицеллах DMPC/DHPC, даже при таком малом значении q, как 0.25 [185]. На основании этого авторы работы заключили, что отсутствие плоского бислоя в мицеллах может нарушить структуру белка, который должен взаимодействовать с поверхностью мембраны. Жёсткие детергенты, которые иногда используются и в мицеллах, и в бицеллах часто

вызывают неправильную укладку водорастворимых доменов различных МБ. Роданезовый домен белка YgaP оказался неправильно свернут в мицеллах DPC и DH_7PC, однако корректная структура домена наблюдалась в смешанных мицеллах LMPG/DH_7PC при небольшом избытке детергента и в нанодисках DMPC/MSP1 [73]. Таким образом, мицеллы и жёсткие детергенты должны применяться с большой осторожностью к МБ, содержащим структурированные примембранные регионы и глобулярные цитоплазматические или внеклеточные домены. Взамен следует рассмотреть использование ЛБН или бицелл с мягкими ободообразующими детергентами. В литературе наблюдался существенный недостаток информации о влиянии различных детергентов на структуру МБ с растворимыми частями, а также о бицеллах с ободом из детергентов на основе производных холиевой кислоты, таких как CHAPS и CHAPSO. Анализ влияния среды на примембранные и внемембранные домены МБ, а также разработка новых составов бицелл с мягкими детергентами в ободе являлись одними из основных задач представленной работы.

Немного другую картину можно наблюдать для интегральных α-спиральных белков и β-бочонков без структурированных водорастворимых частей. Например, конформация стабильного димера битопного белка Bnip3 была определена в бицеллах и смешанных мицеллах DPC/DPPC [45] и оказалась идентичной с точностью до ошибки эксперимента. Скорее всего, если энергия взаимодействий, которые стабилизируют укладку белка, достаточно велика, пространственная структура МБ не будет зависеть от окружения, в то время как для многих белков изменение природы МПС или даже изменение длины ацильных цепей липидов в бислое может изменить пространственную структуру. Наиболее поучительны работы по исследованию вольт-сенсорного домена канала Kvap. Белок оказался свёрнутым неправильно в окружении лизолипидов, таких как LPPG, в то время как нативная структура домена наблюдалась в ЛБН и, что удивительно, в совершенно неестественных детергентах, таких как короткоцепочечный липид DH_7PC [66] и катионный детергент LDAO [46]. Пространственная структура белка в детергентах оказалась практически идентичной структуре, полученной методами РСА после кристаллизации из β-октилглюкозида в комплексе с фрагментом антитела. Этот пример демонстрирует ложность утверждения, что правильная структура МБ всегда получается в окружении, которое по нашим представлением должно быть более нативным. LMPG и LPPG - гораздо ближе к липидам клеточной мембраны, чем DH_7PC и LDAO, но не способны поддержать укладку потенциалочувствительного домена. В последние несколько лет были опубликованы несколько исследований, сравнивающих структуру МБ в детергентах и в бислой-содержащих МПС, которые ясно показывают, что для многих белков есть среда на основе

мицелл, которая в состоянии обеспечить нативную укладку мембранного домена. В частности, "неестественные" мицеллы LDAO сохраняют нативное состояние инсертазы BamA, также как смеси DMPC/DH_7PC и ЛБН [82]. Бактериородопсин, который активен во многих детергентах, правильно сворачивается в мицеллах DDM, амфиполах и ЛБН DMPC/MSP [29,159]. Наконец, ионный канал KcSA можно собрать в нативный тетрамерный комплекс в составе мицелл SDS [22].

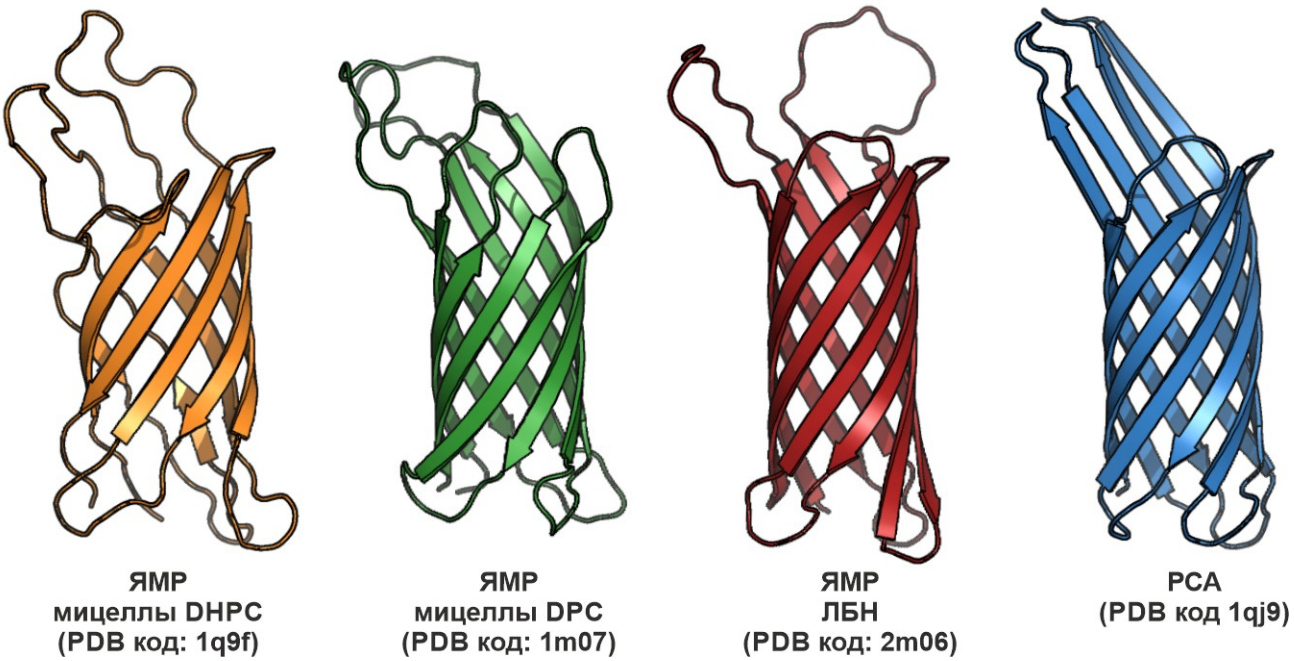

Рисунок 4. Пространственные структуры OmpX, полученные в мицеллах DHPC, DPC, липид-белковых нанодисках и кристаллах.

В качестве другого поучительного примера можно рассмотреть исследования β-бочонка, белка внешней мембраны бактерий OmpX (Рис. 4). Пространственная структура OmpX была определена в двух разных детергентах: DHPC [68] и DPC [135], малых нанодисках DMPC/MSP [135] и в кристаллах с n-октилтетраоксиэтиленом [186]. Если предположить, что правильная укладка осуществляется в ЛБН, и детергенты, и кристаллизация влияют на структуру белка. DHPC и, в некоторой степени, DPC нарушают конформацию β-листов, тяжи становятся короче, а петли - длиннее, чем в ЛБН. При кристаллизации наблюдается совершенно противоположный эффект - структура OmpX оказывается слишком сильно стабилизирована, все петли, которые подвижны в растворе, оказываются зафиксированы и становятся частью общей β-структуры. Эти данные напрямую показывают, что кристаллические структуры белков не могут рассматриваться в качестве идеального эталона, кристаллизация приводит к возникновению ненативных контактов белок-белок, которые меняют конформацию подвижных и

неструктурированных регионов белка - делают их более жёсткими и даже приводят к образованию регулярной вторичной структуры. Именно поэтому до сих пор не ясно, какая из структур ДАГК соответствует нативному состоянию белка - в мицеллах DPC [48] или в кристалле [187]. Структуры совершенно разные и природа расхождения непонятна. Более того, исследование ДАГК, проведенное в мембранах E.Coli методом ЯМР твердого тела [188] показывает вторичную структуру белка, значительно отличающуюся как от найденной в мицеллах, так и от полученной в кристалле.

Таким образом, можно заключить, что для каждого конкретного белка пока что невозможно предсказать, насколько нативной будет его структура в том или ином окружении. При этом, если мы полностью понимаем факторы влияющие на структуру МБ, можно предложить подходы для рационального подбора окружения. С учётом значимости понимания влияния отдельных параметров окружения на структуру и энергию МБ, существенная часть представленной работы посвящена именно изучению данного вопроса.

1.2. Изотопное мечение

Как уже было упомянуто выше, существуют две основных проблемы, с которыми сталкивается исследователь при работе с объектами большого размера при помощи спектроскопии ЯМР. Крупные объекты содержат множество ядер, что приводит к перенаселённости спектров ЯМР, при этом из-за замедленной вращательной диффузии замедляется продольная и ускоряется поперечная релаксация протонов и других ЯМР-активных ядер. Обе проблемы казались неразрешимыми ещё 20 лет назад, в середине 1990х, можно было встретить в литературе статьи с заголовками "ЯМР молекул тяжелее 25 кДа" [189, p. 25]. В то время 20-25 кДа казались верхним пределом применимости метода. Сейчас при помощи спектроскопии ЯМР изучены структуры таких комплексов, как полноразмерная протеасома (1 МДа) [190,191], калиевый канал KcSa в нанодисках (200 кДа) [140], GPCR в мицеллах LMNG (150 кДа) [175]. Все перечисленные работы оказались возможны благодаря двум направлениям развития технологий в области спектроскопии ЯМР: (1) разработке новых методов изотопного мечения и (2) разработке новых импульсных последовательностей с оптимизацией продольной и поперечной релаксации. Несмотря на заметный прогресс спектроскопии ЯМР, расширить пределы применимости метода на объекты массой свыше 100 кДа удалось исключительно за счёт развития методов селективного мечения белков стабильными изотопами. Синтез изотопно-меченых белков осуществляется в основном биотехнологически, при помощи гетерологической продукции в различных культурах клеток. В текущем разделе будут описаны основные методики производства белков для нужд спектроскопии ЯМР высокого разрешения.

1.2.1 Системы для гетерологической продукции изотопно-меченых белков

Гетерологическая продукция или гетерологическая оверэкспрессия - подход, который использует живые клетки других организмов для синтеза белков. Необходимой частью метода является манипуляции с ДНК клетки-хозяина, с целью заставить её производить чужеродный белок. Существуют несколько широко используемых систем для продукции белков, однако для изотопного мечения применяются в основном три - бактерии, дрожжи и клетки насекомых. Каждая система имеет свои преимущества и недостатки, тем не менее, некоторое число МБ удалось успешно наработать в количествах, достаточных для структурных исследовании. При выборе системы продукции есть как минимум три параметра, на которые необходимо обратить внимание, и, возможно, оптимизировать: выход продукта с единицы объёма среды;

правильность укладки белка и его биологическая активность. Также, чрезвычайно важным параметром является стоимость продукции белка.

Бактерии. Бактерии (в первую очередь штаммы *E. coli*) - наиболее широко используемые клетки для продукции меченых белков, начиная с 1980х, когда своё распространение получили методы молекулярного клонирования [192]. Бактерии имеют ряд очевидных преимуществ перед другими системами: они могут расти при высокой плотности в большом количестве различных культуральных сред, чужеродные гены могут с лёгкостью доставляться в такие клетки, используя простейшие системы - плазмиды и трансформацию на основе теплового шока, скорость роста клеток чрезвычайно высока - время удвоения составляет около 30 минут. Культуры бактерий могут выращиваться в ферментёрах, где все параметры окружения контролируются в режиме реального времени для оптимизации выхода целевого продукта. Бактерии способны накапливать большие количества чужеродных белков, выходы продукции в культурах E.Coli могут достигать сотен миллиграммов с литра минимальной среды. Метаболизм бактерий достаточно прост и изучен в деталях, что позволяет получать селективно меченые производные белков из предшественников аминокислот, а также избегать "размывания" селективных изотопных меток используя набор ингибиторов ряда ферментов, участвующих в процессе биосинтеза аминокислот. В качестве предшественников могут использоваться такие молекулы, как глюкоза, хлорид аммония и глицерин. Для синтеза изотпно-меченых МБ в бактериях были предложены несколько стратегий, в основном опирающихся на получение максимальной плотности клеток в дешёвых немеченых средах с последующим переводом в изотопно-меченое окружение и индукцией экспрессии целевого гена [193–196]. Чаще всего для экспрессии используют лактозный промотор и Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид в качестве индуктора. Высокие выходы МБ удавалось получить и при использовании системы экспрессии T7 и автоиндукции [197].

Несмотря на то, что *E. Coli* - наиболее простая в обращении и надежная система для гетерологической продукции, использование бактерий может приводить к ряду проблем, в том числе принципиально непреодолимых. Оверэкспрессия МБ часто является токсичной для клетки, что снижает её жизнеспособность и существенно уменьшает выходы целевого МБ. Когда МБ производится в большом количестве, он склонен агрегировать и образовывать так называемый "тельца включения", что требует процедуры денатурации-ренатурации, которая далеко не всегда может быть осуществлена с получением активной формы белка. Проблемы агрегации и токсичности могут быть решены за счет экспрессии при пониженной температуре или с использованием химерных конструкций с белками-партнерами, такими как Mystic, SUMO,

мальтоз-связывающий белок, GST, тиоредоксин [198,199]. Однако, даже в таком случае, МБ может быть неактивным, из-за того, что в бактериях отсутствует белковая машинерия, необходимая для правильной посттрансляционной модификации.

Дрожжи. Невозможность получить МБ с функциональными посттрансляционными модификациями, а также проблемы с укладкой и активностью МБ являются наиболее существенными недостатками систем продукции на основе бактерий, поэтому в последнее время распространение получили альтернативные системы на основе дрожжей и клеток насекомых. Дрожжи объединяют в себе преимущества как эукариотических, так и прокариотических систем для гетерологической продукции: в них возможен процессинг, фолдинг, формирование дисульфидных связей и посттранслционных модификаций, дрожжи способны быстро расти до высоких плотностей культур и методы генетической манипуляции для дрожжей уже разработаны и широко применяются. Как и бактерии, дрожжи характеризуются простым метаболизмом, что позволяет проводить изотопное мечение на основе дешевых предшественников аминокислот. Среди наиболее широко используемых для изотопного мечения видов дрожжей можно выделить два - *Pichia Pastoris* и *Kluyveromyces lactis.* Для экспресии в *P.pastoris* обычно применяют промотер AOX1, индуцируемый метанолом, существует несколько коммерчески доступных векторов, содержащих данный промотер и ген устойчивости к лекарству. При этом, метанол используется и в качестве индуктора экспрессии, и в качестве источника углерода, что удорожает изотопное мечение (^{13}C-метанол стоит дороже, чем ^{13}C-глюкоза) [200]. В отличие от бактерий, где плазмида в состоянии экспрессироваться самостоятельно, в случае дрожжей кассета генов встраивается в геном за счёт гомологичной рекомбинации ДНК. В случае *K.Lactis* для индукции экспрессии используется промотор LAC4, в качестве индуктора применяются галактоза, которая также может служить источником углерода [200,201, p. 4,202]. Для доставки целевого гена используют векторы pKLAC, содержащий ген ацетамидазы, отбор клонов осуществляется не по устойчивости к антибиотику а по способности клеток использовать ацетамид в качестве источника азота [202,203]. Таким образом, можно отказаться от дорогих антибиотиков и удешевить синтез белков. Основной проблемой *K.Lactis* является потребность в ^{13}C-галактозе, которая существенно дороже глюкозы. Однако, недавно был обнаружен штамм, в котором глюкоза не подавляет промотор LAC4 [203], что позволяет существенно снизить потребность в ^{13}C-глюкозе/галактозе и довести стоимость продукции белков в *K.Lactis* до сопоставимой с бактериями *E.Coli.*

Высшие эукариоты. Несмотря на очевидные преимущества гетерологической экспрессии в культурах дрожжей, далеко не все проблемы можно решить используя эту простую

систему. Некоторые белки требуют наличия специфических шаперонов для правильной укладки полипептидной цепи, в то время как для других объектов функциональное состояние недостижимо без правильного гликозилирования или других посттрансляционных модификаций. Поэтому, в особо сложных случаях можно рассмотреть продукцию целевого белка в культурах клеток высших эукариот. В частности, не так давно были предложены относительно экономичные подходы к изотопному мечению белков в клетках насекомых [204–206]. Экспрессия белков в клетках насекомых проводится на основе бакуловирусов. Бакуловирусы - вирусы насекомых, которые преимущественно заражают животных отряда чешуекрылые (бабочки и мотыльки). Бакуловирусный вектор - это рекомбинантный бакуловирус, который генетически модифицируется для включения гена целевого белка, который затем экспрессируется в клетках насекомых под контролем бакуловирусного промотора. Бакуловирусы не способны заражать позвоночных, а их промоторы не активны в клетках млекопитающих [207]. Наконец, их можно использовать для продукции изотопно-меченых белков не только в культурах клеток но и в живых организмах. Например, не так давно был предложен метод для продукции белков в гемолимфе живых шелкопрядов, заражённых бакуловирусами [208].

В отличие от бактерий и дрожжей, клетки насекомых не могут культивироваться на минимальных средах, содержащих исключительно углеводы и соли аммония, основные типы сред требуют добавления аминокислот. Иными словами, главными недостатками бакуловирусных систем являются дороговизна культуральных сред, сложность создания и отбора векторов с целевым геном и не совсем нативное гликозилирование. Для преодоления первого недостатка было предложено использовать в качестве питательной среды изотопно-меченый экстракт культуры дрожжевых клеток [205]. Это позволяет существенно удешевить продукцию по сравнению с использованием коммерческих питательных сред, однако стоимость выращивания литра культуры клеток насекомых все равно в разы превышает стоимость продукции в дрожжах, не говоря о бактериальных системах [204]. В самых последних работах клетки насекомых применяются для продукции GPCR, селективно меченых по одной аминокислоте [31,175]. Это позволяет в несколько раз снизить издержки и делает бакуловирусную систему доступной для изотопного мечения и исследования белков, которые невозможно экспрессировать в нативной и активной форме в более дешёвых системах гетерологической продукции.

Клетки насекомых характеризуются высокоманнозным гликозилированием, поэтому, если требуются нативные посттрансляционные модификации, применяются либо специально

разработанные линии клеток насекомых с гликозилтрансферазами [209] либо же используются системы на основе клеток млекопитающих - чаще всего - линии клеток яичника китайского хомяка CHO. В последние годы были опубликованы несколько работ по продукции изотопно-меченых иммуноглобулинов в этой системе [210–212]. Аналогично клеткам насекомых, CHO могут культивироваться в средах, где аминокислоты и другие источники углерода и азота мечены стабильными изотопами. Наиболее целесообразным является выращивание белков в культуральных средах, содержащих алгальные (полученные в культурах водорослей в атмосфере $^{13}CO_2$) смеси меченых аминокислот с добавлением аспарагина, глутамина, цистеина и триптофана, которые теряются при гидролизе общего белка водорослей. Стоят такие смеси дорого по сравнению с глюкозой и хлоридом аммония, которые используются в дрожжевых и бактериальных системах, а выходы целевого белка в CHO обычно ниже, чем в клетках насекомых. Для сравнения, можно привести стоимость ^{13}C-глюкозы на конец 2018 года в 190 долларов США за грамм, в то время как стоимость одного грамма $^{13}C/^{15}N$-меченых аминокислот превышает 2000 долларов США согласно данным компании Cambridge Isotope Laboratories, одного из основных производителей соединений, меченых стабильными изотопами в мире. В качестве векторов в системах на основе CHO могут использоваться, например, лентивирусы, экспрессия белков в CHO сопряжена с большим объёмом работ в области генной инженерии - конструирование векторов и ведение линии клеток является трудоёмкой задачей, однако, как показывает практика в редких случаях выходы белка можно довести до 5 граммов с литра культуры [213,214], что, вместе с гарантией нативного гликозилирования, является достаточным обоснованием использования продукции изотопно-меченых белков в клетках млекопитающих.

Бесклеточная система. Ещё одним решением проблемы токсичности, фолдинга и посттрансляционных модификаций мембранных белков может являться их бесклеточная продукция. Суть бесклеточной продукции состоит в том, чтобы избавиться от большинства ненужных компонентов клетки, оставив только то, что необходимо для синтеза белка. Делается это посредством приготовления так называемых экстрактов/лизатов клеток. Удаляются все мембраны, в том числе внутриклеточные, и ДНК, финальные лизаты содержат только машинерию белкового синтеза, включая рибосомы и аминоацил-тРНК синтетазы. При этом, обычно в бесклеточную систему необходимо добавлять T7-полимеразу и T7-промоторную систему для оптимального контроля [215,216]. Для синтеза белка лизат дополняют источниками энергии (АТФ/пируват/креатинфосфат), необходимыми метаболитами (аминокислоты и нуклеозид-трифосфаты), ингибиторами протеаз, тРНК и геном целевого белка. Существуют два основных метода проведения реакции - пакетный и диализный. В первом

случае реакция проводится в едином объёме до полной остановки без поступления дополнительных реагентов, во втором - реакция проводится внутри диализного мешка в реакционной смеси, в то время как снаружи находится в несколько раз больший объем питательной смеси, содержащей аминокислоты и другие необходимые компоненты бесклеточной системы. Использование реакции диализного типа позволяет осуществлять постоянный подвод реагентов и избавляться от продуктов реакции (таких как пирофосфат), которые могут ингибировать синтез целевого белка [217,218].

В настоящий момент бесклеточная продукция является развитой технологией, в литературе можно найти сотни примеров удачного использования различных типов бесклеточных систем на основе лизатов бактерий *E.Coli*, клеток насекомых, клеток млекопитающих HeLa и CHO, ростков пшеницы [219–222]. Стоит отметить, что при приготовлении экстрактов/лизатов обычно удаляется эндоплазматический ретикулуум, что препятствует посттрансляционным модификациям, следовательно не всегда есть смысл делать лизаты эукариотических клеток. Именно поэтому чаще всего применяются бесклеточные системы на основе лизатов бактерий *E.Coli*, такой подход будет наиболее эффективными с точки зрения как цены, так и выхода целевого белка.

Использование бесклеточных систем имеет ряд важных преимуществ перед продукцией целевого белка в культурах клеток. В первую очередь, удаление ДНК и клеточных органелл позволяет получать исключительно целевой белок в высоких количествах. Несмотря на высокую стоимость смесей аминокислот, которые служат источником изотопов для белка в бесклеточной системе, по сравнению с метаболическими предшественниками (глюкозой, сульфатом аммония), расходы на реагенты в расчёте на единицу получаемого МБ оказываются сопоставимыми в бактериях и бесклеточных системах, а с учётом затрат рабочего времени на продукцию и очистку, последние оказываются более выгодными [59]. Во-вторых открытость системы предоставляет уникальные возможности для оптимизации продукции. Исследователь может по своему разумению менять состав реакционной смеси, добавляя туда окислители или восстановители, компоненты, способствующие укладке белка - бивалентные/моновалентные катионы и другие вещества [223]. Наконец, в систему можно внести ферменты, шапероны и другие белки. Возможность ко-трансляционных манипуляций с качеством целевого белка - уникальное свойство бесклеточных систем. Отдельно стоит отметить возможность добавления гидрофобных мембраноподобных сред для ко-трансляционного фолдинга МБ. В реакционную смесь бесклеточных систем включают детергенты, бицеллы, липосомы и ЛБН [41,168,174,224,225]. Некоторые из перечисленных компонентов, в особенности детергенты,

могут ингибировать синтез МБ, однако для ряда МПС можно добиться практически полного встраивания в активной конформации таких белков как семистолбовые бактериородопсин и зрительный родопсин, различные субъединицы АТФ синтазы [173].

Таким образом, можно заключить, что на настоящий момент в распоряжении исследователей находится широчайший набор систем для гетерологической продукции белков. Каждая из систем характеризуется ценой, сложностью работы и качеством фолдинга целевого белка, вместе три параметра определяют финальный выбор. Ниже будут описаны различные варианты изотопного мечения и их применение в ЯМР спектроскопии высокого разрешения.

1.2.2. Тотальное мечение

Тотальное мечение подразумевает полную замену всех ядер ^{12}C и/или ^{14}N на ЯМР-активные изотопы ^{13}C и ^{15}N. Основной целью тотального мечения является получение дополнительной информации, дополнительного измерения в спектрах ЯМР, регистрация трех- и четырехмерных спектров. В учебниках по спектроскопии ЯМР [226] предлагается использовать тотальное мечение по ^{15}N для белков крупнее 5кДа, а "двойное мечение" $^{15}N/^{13}C$ для белков массой свыше 10 кДа. Однако, на настоящий момент принято при возможности все белки исследовать при "двойном" тотальном мечении, независимо от размера, поскольку тотальное мечение существенно улучшает качество получаемой пространственной структуры. Так, мечение по ^{15}N позволяет с высокой точностью измерить константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) $^{3}J_{HNHA}$ и $^{3}J_{NHB}$ и определить значения двугранных углов φ и χ_1 [227,228], а также измерить параметры ЯМР-релаксации и остаточные дипольные константы, получив точное описание ансамбля конформаций, которые принимает объект исследования. Мечение по углероду позволяет измерить уже более десяти различных КССВ [229,230] и получить больше ограничений на расстояния в силу появления дополнительного измерения в спектрах. Однако, стоит иметь в виду, что мечение в несколько раз замедляет исследование. Если для немеченого белка достаточно получить три-четыре двумерных спектра, что требует 2-3 суток приборного времени, то для "дважды меченого" белка требуется регистрация как минимум 10 трехмерных экспериментов, расходы приборного времени увеличиваются на порядок. В результате, для небольших белков тотальное мечение стабильными изотопами азота и углерода существенно увеличивает объем информации о пространственной структуре и динамике белка, в то время как для больших объектов мечение является необходимой процедурой для получения достаточного количества данных.

Процедура продукции тотально меченого белка достаточно проста - бактерии *E.Coli* или дрожжи растят на минимальных средах, в которых источником углерода выступает ^{13}C-глюкоза или ^{13}C-глицерин, а источником азота ^{15}N-хлорид аммония. В случае клеток высших эукариот источником изотопов выступает смесь тотально меченых аминокислот.

1.2.3 Дейтерирование

Особняком стоит получение дейтерированных белков. Дейтерий нельзя назвать удобным ядром для наблюдения в спектрах ЯМР, он характеризуется низким гиромагнитным отношением (отношение между напряжённостью внешнего магнитного поля и собственным магнитным моментом ядра) и широкими сигналами из-за квадрупольной релаксации. Поэтому, дейтерирование производится совсем не с целью увеличения количества информации. В ЯМР спектроскопии релаксация возникает за счёт вынужденных переходов, связанных с локальными осцилляциями электромагнитного поля из-за движения молекулы. В свою очередь, осцилляции возникают из-за анизотропных эффектов, таких как диполь-дипольные взаимодействия, которые зависят от ориентации диполей относительно направления магнитного поля, и анизотропии химического сдвига, связанной с асимметричной формой электронных орбиталей в сложных молекулах. Поскольку ядра водорода (протоны) характеризуются максимальным дипольным моментом, один из основных вкладов в поперечную релаксацию ядер больших молекул вносят именно диполь-дипольные взаимодействия протонов между собой и с гетероядрами. Замена протонов на дейтерий позволяет существенно замедлить поперечную релаксацию большинства ядер крупных белков и получить ЯМР-спектры с узкими линиями. Так, например, скорость поперечной релаксации ядер Cα можно уменьшить дейтерированием почти на порядок, как и релаксацию амидных протонов [231, p. 13]. С другой стороны, необходимо отметить, что протоны являются основным источником информации о структуре белков. Стандартный подход спектроскопии ЯМР в растворе опирается на спектры ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО), интенсивность кросс-пиков в которых определяется расстоянием между протонами в белках. Дейтерирование заставляет обратиться к более экзотическим подходам определения структуры при помощи ЯМР, таких как использование спиновых зондов и остаточных дипольных констант в анизотропных средах. При дейтерировании проводится процедура обратной замены амидных дейтронов на протоны, что не всегда возможно сделать за разумное время, в особенности для мембранных белков, часть которых находится глубоко в частице мембраноподобной среды и недоступна для молекул растворителя. Для обратного внесения амидных протонов в МБ зачастую приходится применять денатурацию/ренатурацию, что может привести к получению неправильной конформации молекулы [232]. В качестве альтернативы тотальному мечению

можно рассмотреть частичное дейтерирование белка (на 50-60%) [231]. Этого достаточного для существенного улучшения качества спектров, в то же время часть протонов сохраняется и может быть использована для регистрации спектров ЯЭО, которые зачастую оказываются гораздо более чувствительными, чем спектры, полученные для полностью протонированных образцов.

Для полного дейтерирования применяют продукцию бактериях или дрожжах с использованием $^{13}C/^{2}H$-глюкозы или глицерина в тяжёлой воде. Такой подход позволяет получить 100% тотальное мечение. Однако, с учётом высокой стоимости $^{13}C/^{2}H$ глюкозы (в 10 раз выше стоимости ^{13}C-меченого соединения), зачастую используют только выращивание культуры бактерий в тяжёлой воде, что позволяет получить степень обогащения дейтерием до 80% [233]. Полное дейтерирование невозможно в клетках насекомых и СНО, из-за того, что они не могут адаптироваться к 100% D_2O [234], а использование дейтерированных метаболитов позволяет получить только до 10% изотопного мечения [205]. Стоит отметить, что в силу высоких издержек и трудностей, связанных с дальнейшим исследованием объекта, дейтерирование является необходимым условием для самых больших белков, массой свыше 30 кДа. К сожалению, практически все МБ оказываются именно в этой категории при помещении в частицу МПС размером от 25 кДа.

1.2.4. Альтернативное мечение

Одной из модификаций тотального мечения является альтернативное мечение $^{13}C/^{12}C$. Суть подхода заключается в продукции белков, в которых чередуются позиции изотопов ^{13}C и ^{12}C таким образом, что в двух соседних сайтах не могут находиться два одинаковых ядра [235]. Методика приводит к существенному улучшению чувствительности спектров ЯМР тройного резонанса, в первую очередь HNCA, поскольку позволяет избавиться от нежелательной КССВ Cα-Cβ и превратить раздвоенные сигналы от Cα в синглетные. Осуществляется такое мечение в бактериях при продукции на минимальных средах, содержащих 2-^{13}C- или 1,3-$^{13}C_2$-глицерин. Стоит отметить, что методика не получила широкого распространения в силу ряда очевидных недостатков - альтернативное мечение не может применяться для регистрации других спектров тройного резонанса, кроме HNCA и HNCO, все остальные эксперименты опираются на перенос когерентности между двумя соседними углеродами. Более того, для получения полного объёма информации о химических сдвигах ядер Cα необходимо приготовить два образца, что делает альтернативное мечение чрезвычайно дорогим подходом с ограниченной областью применения.

1.2.5. Селективное мечение

Под селективным мечением обычно понимают стратегии продукции белков/ДНК/РНК, которые подразумевают наличие изотопных меток в конкретных положениях молекул. Аналогично тотальному мечению, селективное мечение может применяться с различными целями - для упрощения вида спектров, для оптимизации поперечной релаксации, для минимизации расходов на исследование.

Селективное мечение по типу аминокислоты. Первые работы в области были связаны с продукцией белков, меченых по аминокислотам определённого типа. Такая стратегия позволяет существенно упростить спектры ЯМР, уменьшив количество сигналов, а также получить дополнительную информацию, необходимую для проведения отнесения химических сдвигов. Стандартным способом получения селективно меченых по отдельным аминокислотам белков до последнего времени являлась продукция в бактериальных культурах с добавлением тотально меченых аминокислот. Однако, при таком подходе невозможно селективное мечение по ряду а.к., например, по глутаминовой кислоте из-за так называемого "размывания". Многие аминокислоты являются участниками путей биосинтеза других а.к., добавление меченых производных таких а.к. приводит к переносу изотопной метки и потере специфичности мечения [236,237]. Размывания метки можно избежать частично или полностью, для этого были разработаны несколько подходов. Во-первых, можно вмешаться в метаболические пути бактерий и создать ауксотрофные штаммы, неспособные синтезировать некоторые аминокислоты, что предотвращает размывание метки. Для Arg, Cys, Gln, Gly,His, Ile, Lys, Met, Pro и Thr достаточно делеции одного гена для создания ауксотрофного штамма *E.Coli*, для других аминокислот необходимо более существенное редактирование генома бактерий [238]. Второй подход называется "обратным мечением", и заключается в продукции белка в культуре бактерий, где все аминокислоты добавляются в немеченом виде, кроме целевой а.к., которая отсутствует в питательной среде, в которой также наличествует соль 15N-аммония. При такой схеме, клетки потребляют все а.к. из окружающего раствора, в то время как целевая а.к. синтезируется из аммония и глюкозы , что позволяет значительно снизить размывание изотопной метки [239]. Наконец, в последнее время селективное мечение по отдельным а.к. чаще всего стали проводить в бесклеточных системах [59,240,241]. В рибосомальных экстрактах отсутствует большая часть ферментов биосинтеза аминокислот, а в силу открытости системы активность оставшихся можно подавить добавлением специфических ингибиторов, что позволяет получать селективно меченые белки дёшево, без эффекта размывания изотопов [242]. Стоит отметить, что в бесклеточной системе возможно селективное мечение не только по

конкретному типу аминокислоты, но и в конкретном положении первичной структуры. Это делается за счёт использования стоп-кодона и комплементарной аминоацил-тРНК [243]. Подход является достаточно дорогим и применяется в основном для введения нестандартных аминокислотных остатков или спиновых зондов [244,245].

В ряде работ селективное мечение проводилось при продукции МБ в клетках насекомых [31,32,246]. Делалось это не для упрощения вида спектров, а в целях экономии средств в связи с дороговизной синтеза белка в данной системе. Авторам одной из недавних статей удалось получить образцы селективно меченого по остаткам валина и изолейцина β-2 адренергического рецептора в нанодисках и мицеллах DDM, которые затем использовались для анализа механизма действия различных низкомолекулярных соединений, способных связываться с рецептором.

Селективное мечение по отдельным группам аминокислоты. В отличие от мечения по отдельным аминокислотам, сайт-специфическое изотопное мечение применяется в первую очередь для оптимизации поперечной релаксации при тотальном дейтерировании. Как уже было упомянуто выше, дейтерирование приводит к потере значительного количества информации из-за невозможности измерения расстояния между протонами с использованием спектроскопии ЯЭО. С другой стороны, амидные протоны, сигналы которых обычно регистрируют при тотальном дейтерировании белков являются далеко не оптимальными ядрами для наблюдения в случае больших объектов из-за быстрой поперечной релаксации, которую нельзя полностью нивелировать средствами импульсных последовательностей ЯМР (см. ниже). Оптимальными ядрами для детекции являются метильные группы, которые, в силу свободного вращения вокруг связи CC, релаксируют достаточно медленно даже в больших белках, при условии, что в их окружении отсутствуют другие протоны, вызывающие диполь-дипольную релаксацию. Именно поэтому были разработаны схемы изотопного мечения, при которых на фоне тотально дейтерированного белка, метильные группы некоторых аминокислот метятся ^{13}C и остаются протонированными. Существует две основных стратегии такого сайт-специфического изотопного мечения. Первая применяется для белков среднего размера 30-80 кДа, когда стандартные методы ЯМР-спектроскопии с использованием переноса намагниченности через КССВ еще могут применяться для отнесения сигналов. В этом случае белок метится $^{15}N/^{13}C/^{2}H$, метильные группы получают в варианте $^{13}C/^{1}H$. Это позволяет при помощи экспериментов HCCH-TOCSY и трех- и четырехмерных спектров NOESY-HSQC соотнести амидные протоны с метильными группами и получить полное отнесение сигналов. Вторая схема применяется для сверхбольших белков (свыше 100 кДа) или для регистрации финальных спектров ЯЭО в случае

белков размером 30-100 кДа. В рамках данной схемы весь белок остаётся меченым $^{12}C/^{14}N/^{2}H$, а метильные группы - $^{1}H,^{13}C$. Таким образом можно ещё больше оптимизировать поперечную релаксацию метильных групп и избавиться от нежелательной прямой КССВ ^{13}C-^{13}C, увеличив чувствительность спектров в 1.5 раза. При этом, для самых больших объектов массой свыше 60-70 кДа отнесение сигналов в спектрах приходится проводить с использованием точечного мутагенеза [190,191] . Каждый из остатков с метильной группой заменяется на близкий по свойствам (например, лейцин заменяется на изолейцин или валин) и по исчезновению пика из спектров ЯМР делается вывод о соответствии пропавшего пика заменённому остатку. Изначально подход был разработан для метильных групп Leu, Val и δ1-Ile и опирался на синтез белка в бактериях с использованием специальных предшественников указанных аминокислот - α-кетомаслянной кислоты (в случае изолейцина) и α-кето-изовалериановой кислоты (в случае валина и лейцина) [247,248]. Впоследствии были предложены аналогичные подходы для мечения метильных групп Thr, Ala, Met и γ2-Ile [249–254] Наконец, в последние годы были предложены методы стереоспецифического мечения метильных групп остатков Leu и Val, когда в спектрах ЯМР регистрируются сигналы только от pro-S или pro-R метильных групп, в зависимости от выбранного метаболита, что позволяет существенно упростить вид спектров и получать точную информацию о структуре белка [255]. Помимо разработки новых схем, много усилий было потрачено и на методы продукции. Так, были созданы новые ауксотрофные штаммы *E.Coli* специально для продукции белков меченых селективно по метильным группам Ile, Leu, Val [256]; были разработаны протоколы получения метил-селективно меченых белков в культурах дрожжей *P. Pastoris* [257]; мечение метильных групп аланинов удалось осуществить в бакуловиросной системе [258]. В одной из самых недавних работ для продукции метил-меченых белков удалось приспособить и бесклеточную систему. До последнего времени считалось, что машинерия для биосинтеза аминокислот из кетобутиратов и кетоизовалериатов утрачивается при приготовлении лизатов бесклеточных систем. Поэтому, было предложено получать селективно меченые по метильным группам аминокислоты при синтезе МБ в тельцах включения бактерий и последующем гидролизе [259]. В качестве такого белка был выбран бактериальный белок OmpX, который можно нарабатывать с выходами до 500 мг с литра питательной среды. Синтезированные аминокислоты после гидролиза просто добавляются в питательную смесь бесклеточной системы. В 2018 году был проведён анализ протеома различных лизатов *E.Coli*, который показал, что так называемый S30 лизат содержит практически все необходимые ферменты для биосинтеза аминокислот из 2-кетоизовалериата и 4-метил-2-оксо-валериата [260]. При добавлении всего одного рекомбинантного фермента IlvE, в бесклеточных системах на основе S30 лизатов можно получать меченые по метильным

группам Leu и Val белки с высокими выходами, затраты на меченые метаболиты оказываются на порядок меньше, чем при использовании продукции в культурах клеток.

Стоит отметить, что метильные группы - не единственный удобный вариант для детекции спектров ЯМР больших белков, при сохранении дейтерированного фона можно регистрировать спектры и слективно-меченых по отдельным положениям ароматических остатков. Аналогично метил-селективному мечению для ароматических остатков были также разработаны метаболические предшественники, позволяющие получить белок в культурах клеток бактерий [261,262]. Поскольку синтез таких предшественников достаточно дорог и не налажен в промышленном варианте, методика пока что не получила своего распространения. При этом, метил-селективное мечение можно считать уже устоявшимся подходом, с его использованием проведены уже ставшие классическими работы по изучению отдельных субъединиц и полноразмерной протеосомы (1 МДа, [191]), GPCR (150 кДа в составе мицеллы DDM, [31]), митохондриального мембранного белка VDAC-1 (70 кДа в мицелле LDAO, [44]), малат синтазы G (80 кДа, [263]) и многих других белков.

SAIL. Еще одним вариантом селективного мечения, направленным на оптимизацию релаксации ядер, является так называемое стереоспецифическое изотопное мечение или SAIL (stereo-array isotope lalbeling, англ.). Подход разрабатывается с начала 2000х годов в лаборатории M. Kainosho [264]. Исходный метод заключался в том, что синтезируются аминокислоты, где все CH_2 группы заменены на CHD, а все CH_3 - на CHD_2, при этом, если в метильной или метиленовой группе содержится протон, то в соседней группе его быть не должно [265]. Полученные аминокислоты затем используются для продукции белков в ауксотрофных штаммах бактерий или бесклеточных системах [65]. Цель такой стратегии - проредить цепочку протонов, которые могут участвовать в диполь-дипольных взаимодействиях, чтобы ослабить релаксацию. Поскольку энергия диполь-дипольных взаимодействий в макромолекулах обратно пропорциональна шестой степени расстояния между ядрами, удаление ближайших протонов может увеличить среднее расстояние между протонами в 2-3 раза, что приведёт к многократному замедлению поперечной релаксации по диполь-дипольному механизму. Дейтерирование протонов метиленовых групп производится стереоспецифически, упрощая процедуру отнесения сигналов в спектрах ЯМР. В рамках оригинального подхода все углероды и азоты белка были мечеными стабильными изотопами, чтобы оставить возможность последовательного отнесения с использованием стандартных методик ЯМР, а суммарная степень дейтерирования составляла около 40%, позволяет применять методику для белков размером 30-50 кДа. В более поздних версиях SAIL авторы разработали новые стратегии с

более высоким уровнем дейтерирования и отсутствием ^{13}C в соседних положениях, в том числе для ароматических сигналов [266]. Указанная схема расширила границы применимости подхода до размера белков 80-100 кДа. Так, применение SAIL-мечения позволило зарегистрировать спектры ароматических остатков малат синтазы G, белка массой 82 кДа, получить полное отнесение сигналов и уточнить пространственную структуру [267].

Следует отметить, что несмотря на очевидную привлекательность подхода SAIL, до сих пор не ясна его экономическая целесообразность. SAIL аминокислоты получают химическим синтезом, а не биотехнологически, и их невозможно купить, из-за законодательства Японии об обороте стабильных изотопов. Поэтому, работы с SAIL осуществляются исключительно в Японии в лаборатории M. Kainosho, сравнить издержки SAIL по сравнению с метил-селективным мечением на основе метаболических предшественников, пока не представляется возможным.

1.2.6. Комбинаторное мечение

Одним из примеров использования селективного мечения не только для перечисленных выше задач, но и для отнесения сигналов является комбинаторное мечение. Суть подхода заключается в селективном мечении остатков белка различными изотопами по группам для однозначной идентификации пар остатков. Например, часть аминокислот объекта метятся по ^{15}N, часть - по ^{13}C и регистрируются два спектра ЯМР - ^{15}N-HSQC (наличие пика означает, что а.к. мечена по ^{15}N) и HNCO (наличие пика означает, что данная а.к. мечена по ^{15}N, а предыдущая в последовательности - по ^{13}C). Мечение производят в бесклеточной системе, чтобы избежать эффекта "размывания". С использованием достаточно простых алгоритмов можно рассчитать минимальный набор различных образцов, где разные типы аминокислот имеют разную схему изотопного мечения, который позволяет получить максимальное отнесение сигналов в спектрах HSQC [59,268]. Подход можно удешевить, используя не тотально меченые а.к., а молекулы, меченые только по карбоксильным группам [241]. Или же наоборот, усложнить и метить часть аминокислот $^{15}N/^{13}C$, регистрируя третий спектр - HNCAi для их идентификации, что позволяет уменьшить общее число образцов, хоть и увеличивает стоимость каждого отдельного образца [269]. Как оказалось, использование комбинаторного мечения оправдано для больших МБ и с экономической, и с практической точки зрения. Для больших МБ достаточно сложно получить спектры тройного резонанса за исключением HNCA и HNCO, что ограничивает объем информации, доступный для проведения отнесения сигналов. Более того, большинство МБ имеют α-спиральную структуру, а спектры ЯМР α-спиральных белков характеризуются малой дисперсией химических сдвигов. Поэтому, комбинаторное мечение, с помощью которого можно

классифицировать все пары спиновых систем по типам аминокислотных остатков, дополненное спектрами HNCA и NOESY-HSQC, позволяет получить отнесение сигналов в количестве, достаточном для определения пространственных структуру, что было продемонстрировано на примере ТМ домена гистидиновой киназы [59].

1.2.7. Сайт-специфическое мечение фтором.

Ещё одним вариантом использования изотопного мечения для оптимизации релаксации и детекции спектров ЯМР больших молекул может служить мечение молекулы ЯМР-активными изотопами, не встречающимися в природных соединениях, например фтором. Фтор является чрезвычайно удобным ядром для изучения больших МБ - его основной изотоп ^{19}F имеет спин 1/2 и высокое гиромагнитное отношение, чувствительность по фтору в спектрах ЯМР превышает чувствительность по протонам. Существует множество других свойств ^{19}F, которые делают данный изотоп превосходным источником информации о структуре белков и нуклеиновых кислот. В первую очередь это - высокая чувствительность химического сдвига фтора к окружению, что приводит к большому разбросу сигналов ^{19}F в спектрах. Основной вклад в химический сдвиг фтора вносит парамагнитный терм, поэтому ядра ^{19}F чрезвычайно восприимчивы к локальным ван-дер-ваальсьсовыским взаимодействиям и электростатическим полям. Положение резонанса ^{19}F по сравнению с химическим сдвигом соответствующего денатурированного состояния отлично коррелирует с заглубленностью в структуре белка и даже очень небольшая разница в полярности между D_2O и водой приводит к измеримым отличиям химических сдвигов фтора экспонированных в растворитель остатков [270]. Диапазон химических сдвигов фторалифатических и фтораароматических меток в зависимости от структуры белка более чем в 100 раз превышает такой же диапазон для ^{1}H. Широкий диапазон химических сдвигов чрезвычайно удобен при исследовании слабых взаимодействий, фолдинга белков, кинетики ферментативных реакций. Во-вторых, это - отсутствие "фона". Фтор редко встречается в природных соединениях, поэтому меченую молекулу можно легко наблюдать даже в сложных смесях с обычными органическими соединениями.

Есть множество способов, которыми фторные метки могут включаться в структуру объекта исследования, они перечислены ниже. В любом случае, модификации чаще всего не приводят к существенным изменениям в структуре белков [271–273]. Ван-дер-ваальсов радиус фтора всего на 20% больше, чем у протона, но взаимодействия фтор-фтор существенно усиливаются за счёт фтор-стабилизирующего эффекта и включение нескольких атомов фтора может привести к нарушению взаимодействий белка с водой. В то время как данные нежелательные явления можно нивелировать, уменьшая содержание фтора, встречаются случаи,

когда даже несколько монофторированных аминокислот существенно меняли характеристики белков [274].

Существует два способа, которыми атом фтора можно ввести в молекулу белка: биосинтетически, когда среда для культивирования дополняется фторированным аналогом аминокислоты; и химически, когда фторированная группа реагирует с определенным остатком белка. Разработка новых неприродных аминокислот, в первую очередь аналогов фенилаланина, позволяет достичь биосинтетического сайт-специфического мечения со значительными выходами целевого белка [275,276]. Стоит отметить, что биосинтетический подход сопряжён с рядом трудностей: (1) фторированные предшественники могут быть токсичны для клеток, что понижает выход целевого белка, (2) связывание с соответствущей аминоацил-тРНК синтетазой нестандартных аминокислот может быть недостаточным для продукции необходимых тРНК, (3) нарушения, вызванные включением нестандартных аминокислот, могут накапливаться и приводить к инактивации/неправильной укладке белка и (4) большинство коммерчески доступных фторированных аминокислот являются ароматическими, а иногда может быть необходимо поместить изотопную метку в положение, несовместимое с ароматическим остатком. Поэтому, привлекательной стратегией может быть и пост-трансляционное сайт-специфическое мечение. Наиболее частой мишенью для ковалентной модификации является цистеин из-за высокой нуклеофильности сульфгидрильной группы. В белках обычно присутствует ограниченное количество доступных для модификации остатков цистеинов, что приводит к специфичности мечения и простоте процедуры отнесения, в то время как стратегии точечного мутагенеза позволяют пометить сайт-специфически необходимое положение в полипептидной цепи [277]. Амино-группы лизинов (и N-конца белка), а также, в меньшей степени, гидроксильные группы серинов и треонинов также подлежат нуклеофильной ковалентной модификации [278,279]. Обычно, химическое мечение проводится по механизму нуклеофильного замещения, что сохраняет нативный заряд на боковых цепях лизинов. Фторные метки для химической модификации обычно представляют собой активированные производные трифторметильных групп, которые характеризуются сравнительно узкими сигналами из-за быстрого вращения вокруг оси симметрии, что делает их чрезвычайно привлекательными для исследований больших комплексов и мембранных белков [280]. Наиболее часто используемым реагентом является 3-бромо-1,1,1,-трифторацетон (БТФА), который применялся для мечения как мембранных, так и растворимых белков. Для мечения с использованием БТФА требуется простая одностадийная реакция, при этом соединение является коммерчески доступным, не содержит детектируемых фтор-протонных констант и имеет небольшой размер, вызывая

минимальные нарушения в структуре белков. Так, используя серию цистеиновых мутантов, трифторметильная группа была внедрена в структуру ДАГК с использованием БТФА. На основе парамагнитных сдвигов от растворённого в воде кислорода, авторы смогли идентифицировать ТМ участки, и остатки, участвующие в контактах белок-белок и белок-мембрана [281].

Другой цистеин-специфичной меткой является трифторэтантиол (ТФЭТ), который присоединяется к белку посредством дисульфидной связи. К преимуществам ТФЭТ можно причислить специфичность к сульфгидрильным группам, а также увеличенную подвижность по сравнению с БТФА, карбонильная группа которой налагает ряд пространственных ограничений на метку. При исследовании родопсина, двойные цистеиновые мутанты белка, помеченные ТФЭТ позволили оценить расстояния между петлями в белке, что является демонстрацией подхода на основе ^{19}F-ЯМР к установлению третичных контактов в макромолекулах большого размера [282]. Среди других перспективных реагентов для фторного мечения по цистеинам можно упомянуть S-этилтрифтортиоацетат (SETFA), янтарный ангидрид трифторацетамида (TFASAN), N-[(4-трифторметил)-фенил]-йодацетамид, 4-(перфтор-трет-бутил)-фенилйодацетамид (PFP), р-нитрофенилтрифторацетат [283]. Несмотря на большой размер, PFP характеризуется высочайшей чувствительностью из-за 9 эквивалентных атомов фтора, не участвующих в скалярном спин-спиновом взаимодействии. Например, сигналы от 75 мкМ образца фтор-меченого G-актина можно детектировать за одно накопление, что позволяет детектировать процесс полимеризации в реальном времени, снимая спектры ^{19}F каждые 2.7 минут [284]. Структуры основных реагентов для фторного мечения методом химической модификации показаны на рисунке 5.

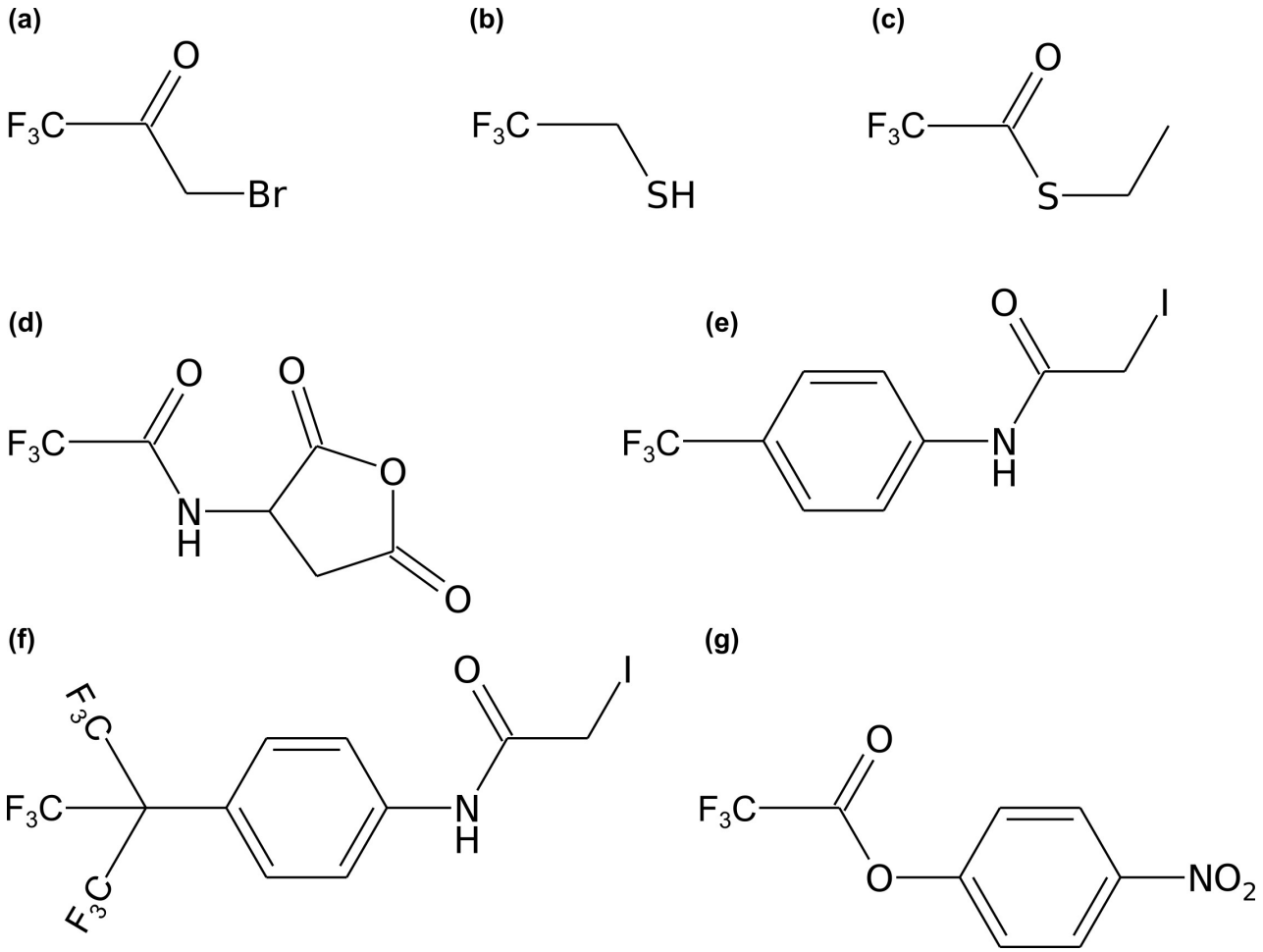

Рисунок 5. Структура основных реагентов, использующихся для введения пост-трансляционных изотопных меток ^{19}F. a - БТФА, b - ТФЭТ, c - SETFA, d - TFASAN, e - N-[(4-трифторметил)-фенил]-йодацетамид, f - PFP, g - p-нитрофенилтрифторацетат.

1.2.8. Сегментное мечение

Сегментным мечением называется подход, предполагающий изотопное мечение фрагмента белка (например, отдельного домена), в то время как остальная часть молекулы остаётся немеченной. Применение сегментного мечения позволяет справиться с рядом затруднений, возникающих при работе с белками большой массы. Во-первых, упрощается анализ спектров ЯМР, в силу отсутствия ряда сигналов, во-вторых, сегментное мечение позволяет решить ряд проблем с продукцией белков. Если какой-то из доменов белка может быть получен в нативном состоянии при гетерологической продукции в культуре бактерий, в то время как другие домены белка с правильной укладкой могут быть получены исключительно в клетках эукариот, то взаимодействия между доменами в таком белке можно сравнительно недорого изучать только посредством сегментного мечения. Сегментное мечение опирается на известные механизмы посттрансляционных модификаций белков, в первую очередь на механизмы белкового сплайсинга. Для осуществления такого мечения было предложено четыре

подхода: лигирование экспрессированного белка или нативное химическое лигирование [285], белковый транс-сплайсинг (БТС) [286], сортаза-опосредованное лигирование [287] и лигирование аспарагинил эндопептидазой [288]. Первые два метода используют интеины - элементы белкового сплайсинга, название которых произошло от англ. internal protein, внутренний белок. По сути интеины в белках схожи с интронами в мРНК, они включаются в открытую рамку считывания гена кодируемого белка, а затем осуществляют гидролиз и лигирование между собой фрагментов полипептидной цепи. В итоге получается последовательность белка за вычетом самого интеина. По аналогии с интронами и экзонами, лигируемые фрагменты называются экстеинами [289]. Для сегментного мечения методом БТС используются так называемые "сплит-интеины", в случае которых рамка считывания белка предшественника фрагментируется на два отдельных гена, при этом разрыв в последовательности происходит в интеиновой части.

Лигирование фрагментов белка, в случае интеинов, не требует АТФ или другого внешнего источника энергии, и полностью определяется структурой интеина, закодированной его аминокислотной последовательностью, и первым остатком С-концевого экстеина, который принято называть остатком "+1" [290]. Общепринятый механизм белкового сплайсинга на настоящий момент включает четыре последовательных реакции нуклеофильного замещения, запускаемых ассоциацией N- и C- концевых фрагментов интеина, в случае сплит-интеинов. В первой реакции последовательность N-концевого экстеина переносится на боковую цепь первого остатка интеина за счёт ацильной перегруппировки N-X (где X-сера или кислород), в результате чего получается промежуточный продукт в виде линейного эфира. На втором шаге происходит трансэтерификация, нуклеофильный остаток +1 атакует эфирную связь линейного продукта, в результате чего получается разветвленный эфир, в котором N-экстеин присоединен к С-экстеину эфирной связью. Третий этап катализируется последним остатком интеина, обычно это аспарагин, который циклизуется, формируя сукцинимидное кольцо и отщепляется от разветвлённого эфира. На последнем этапе проходит спонтанная N-X ацильная перегруппировка в эфире экстеинов, в результате которой образуется пептидная связь и финальная последовательность белка. Таким образом, если один из фрагментов целевого белка произвести в изотопно-меченом виде в химерной конструкции с N-интеином, его можно лигировать с немеченым доменом белка, если последний находится в химерной конструкции с С-интеином. При этом сплит-интеины можно создавать искусственно, внося разрывы в последовательность природных интеинов и на самом деле искусственные сплит-интеины появились раньше, чем были найдены первые природные [291]. Было показано, что используя

различные пары сплит-интеинов можно разрабатывать сложные схемы изотопного мечения, например те, в которых меченым оказывается центральный домен из трех.

Лигирование экспрессированного белка или нативное химическое лигирование также использует интеины для продукции сегментно-меченого белка. Однако, в данном случае, вместо сплит-интеина используется обычный интеин, который присоединен к N-экстеину. Химерную конструкцию химически превращают в линейный эфир, который затем реагирует с C-экстеином, первым остатком которого должен быть цистеин [292]. БТС имеет ряд неоспоримых преимуществ перед нативным лигированием. Во-первых, нативное лигирование требует приготовления линейного эфира in vitro, непосредственно перед реакцией. Во-вторых, в случае БТС, в зависимости от интеина, остатком на C-конце N-экстеина может выступать цистеин, серин или треонин, в то время как для нативного лигирования допустимо только использование цистеина. Это открывает дополнительный простор для инженерии конструкций экстеин-интеин, которые способны сохранять нативную последовательность линкера между доменами после сплайсинга. Также БТС обеспечивает дополнительную аффинность между реагентами, за счет взаимодействия между сплит-интеинами, что повышает выход реакции. В случае БТС, реакция лигирования может проходить in vivo, параллельно трансляции белка в процессе гетерологической продукции, а объединение нескольких фрагментов может проходить в одной пробирке в одну стадию, в то время как для нативного лигирования несколько фрагментов могут быть соединены в одну цепь только последовательными реакциями. В силу перечисленных выше причин технология БТС получила наиболее широкое распространение при сегментном мечении белков. В частности, из последних работ можно выделить исследование GPCR β2AR, в котором изотопно меченый фрагмент лигировался к трансмембранному домену с использованием БТС [293]. β_2AR в нативном виде можно получать только в клетках эукариот, что существенно удорожает изотопное мечение, поэтому применение БТС позволило в деталях изучить влияние фосфорилирования на структуру белка.

Сортаза A и аспарагинил-эндопептидаза - это специфические ферменты, распознающие конкретную последовательность аминокислот на N- и C- концах двух лигируемых фрагментов. Сортаза A из *S. aureus* распознает достаточно короткий фрагмент - последовательность LPxTG на C-конце одного фрагмента и последовательность GG, в результате лигирования в целевом белке возникает вставка LPxTGG, что практически гарантирует ненативность последовательности линкера между доменами в случае сегментного мечения. Также, стоит иметь в виду, что сортаза A будет катализировать и обратную реакцию гидролиза, поскольку сайт распознавания присутствует и в целевом белке, что уменьшает выход объекта и его

чистоту. Поэтому, несмотря на очевидные преимущества подходов на основе сортазы А, связанных с отсутствием крупных белковых фрагментов (сплит-интеинов), которые могут помешать укладке фрагментов целевого белка, сортаза-опосредованное лигирование в последнее время применяется редко [294]. Подход на основе аспарагинил-эндопептидазы (АЭП) является наиболее новым и был впервые предложен в 2017 году [295]. АЭП это фермент растений, который катализирует транспептидазную реакцию при циклизации циклотидов. АЭП *Oldenlandia affinis* может эффективно продуцироваться в бактериях, что делает его дешевым аналогом сортазы А [296], при этом сайт распознавания фермента является минимальным - GL и TRN/GL для N- и C-концов субстратов, где TRNGL - сайт распознавания, а GL- сайт лигирования. АЭП может работать даже при условии наличии некоторых мутаций в сайте распознавания, в результате в последовательности белка возникает минимальная вставка NGL, что позволяет получить нативную или практически нативную первичную структуру лигированного продукта. Выходы лигированного белка достаточно высоки и составляют до 90% при инкубации в течение ночи [288]. Поэтому, несмотря на то, что система на основе АЭП была разработана совсем недавно, ее перспективы достаточно высоки.

Таким образом, можно заключить что разработан широкий круг методов изотопного мечения, который может решить две основные проблемы при работе с большими белками методами ЯМР высокого разрешения - оптимизировать поперечную релаксацию и упростить вид спектров ЯМР, уменьшив число сигналов. Параллельно с развитием методов белковой инженерии последние 20 лет шла активная разработка новых методик ЯМР-спектроскопии, специализированных для беков большого размера.

1.3. Методики ЯМР для работы с большими белками

1.3.1. Оптимизация поперечной релаксации. ^{1}H-^{15}N-TROSY.

Первые импульсные последовательности ЯМР-спектроскопии достаточно мало внимания уделяли релаксации ядер, поскольку создавались и опробовались в первую очередь для небольших молекул с долгой поперечной релаксацией протонов и гетероядер. Однако, к середине 1990х годов, с развитием методик изотопного мечения и гетерологической продукции, стало понятно, что для ЯМР-спектроскопии больших белков необходимо оптимизировать релаксацию намагниченности во время импульсной последовательности. Причём, в первую очередь это касается именно поперечной релаксации, поскольку для белков массой свыше 10-15 кДа быстрая поперечная релаксация вносит решающий неблагоприятный вклад в качество спектров ЯМР. Первый оптимизированный эксперимент был предложен российским ученым, Константином Первушиным, для импульсной последовательности ^{1}H,^{15}N-HSQC (гетероядерная одноквантовая когерентность), спектра, в котором наблюдаются сигналы от NH групп [297]. В HSQC детектируются сигнал двух ядер, связанных константой спин-спинового взаимодействия, из-за чего для каждой пары NH можно зарегистрировать четыре кросс-пика, соответствующих четырём разрешённым переходам между спиновыми состояниями азота и водорода. Как оказалось, для больших белков эти четыре кросс-пика характеризуются совершенно разной поперечной релаксации, один из пиков является очень узким, один - очень широким, в то время как два остальных уширены по оному из направлений спектра (Рис. 6). Это связано с так называемой интерференцией между двумя механизмами релаксации - анизотропией химического сдвига и диполь-дипольным взаимодействием H-N. В зависимости от спинового состояния данные механизмы вносят вклады различного знака в скорость поперечной релаксации, для одного из переходов, вклады двух механизмов взаимно уничтожаются, "интерферируют". В случае стандартной ЯМР-спектроскопии при детекции спектров HSQC применяется развязка, которая уничтожает эволюцию через КССВ, в результате наблюдается один широкий сигнал с усреднёнными параметрами. Авторы работы предложили иную стратегию - выбрать один из спиновых переходов, для которого наблюдается интерференция вкладов, уничтожив остальные три сигнала. Это можно осуществить при помощи импульсов градиента магнитного поля и циклического синхронного изменения фаз некоторых импульсов и приёмника (фазового цикла). При этом, теряется 3/4 от общей намагниченности, однако, выигрыш от оптимизации релаксации оказывается настолько велик, что оставшаяся четверть "активных" спинов позволяет получить интенсивность сигнала, заметно превышающую интенсивность пика с усреднённой релаксацией от 100% спинов в классическом спектре HSQC.

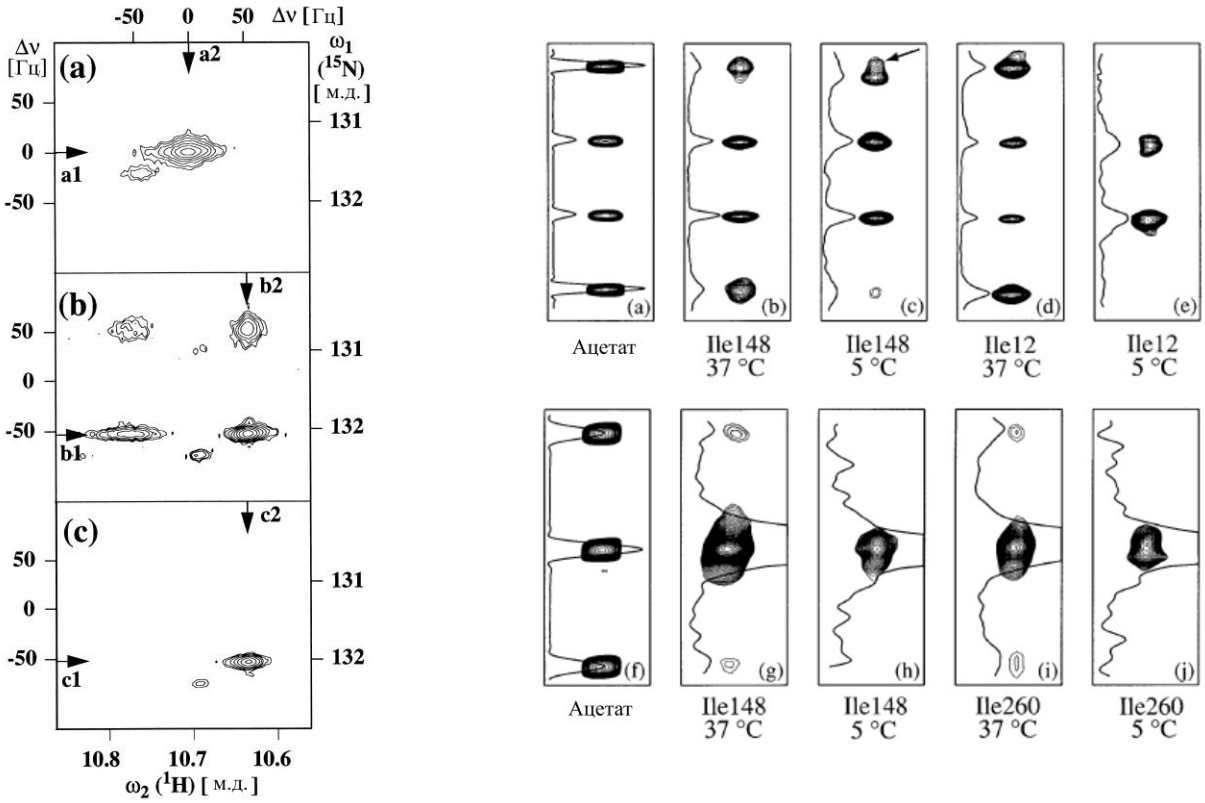

Рисунок 6 (воспроизведен из статей [297,298])**.** слева - кросс-пик от HN индольного кольца остатка Trp 48 гомеодомена белка frz (8 кДа) в комплексе с дуплексом ДНК длинной в 14 пар оснований: в классическом спектре ^{1}H,^{15}N-HSQC с развязкой **(a)** и без развязки **(b)**, в спектре TROSY **(c).** Справа - мультиплеты метильных групп малат синтазы G в спектрах HSQC (вверху) и HMQC (внизу), записанных без развязки от протонов при 37 и 5 ºС. Для сравнения приведены мультиплеты метильной группы уксусной кислоты (самые левые полоски), вещества с чрезвычайно медленной поперечной релаксацией. Различие параметров релаксации отдельных компонентов мультиплета в "больших" объектах обусловлено "интерференцией" между вкладами от диполь-дипольных взаимодействий ^{1}H-^{1}H и ^{1}H-^{13}C.

Данный похдход был назван TROSY (англ. Transverse Relaxation Optimized SpectroscopY, спектросокпия с оптимизированной поперечной релаксацией). Название прижилось и в настоящее время применяется для всех экспериментов, использующих интерференцию механизмов релаксации. Оказалось, что одним из необходимых условий оптимального использования TROSY является полное дейтерирование боковых цепей белка, поскольку вклад от диполь-дипольных взаимодействий между протонами данный эксперимент скомпенсировать не в состоянии. Теоретически, при тотальном дейтерировании для белка массой 150 кДа при помощи TROSY можно добиться линий сигналов с полушириной 5 Гц по азотам и 15 Гц по протонам. Также теоретические расчёты показали, что оптимальной напряжённостью магнитного поля для эксперимента ^{1}H-^{15}N TROSY является 26 Тесла, что соответствует резонансной частоте протонов 1100 МГц. Данное предсказание послужило мотивацией для разработки высокопольных ЯМР-спектрометров в конце 1990х годов, которая продолжается и

до сих пор. На настоящий момент уже функционирует спектрометр с рабочей частотой 1 ГГц, компания Bruker Biospin анонсировала строительство прибора с частотой 1.2 ГГц.

Впоследствии так называемый TROSY-эффект нашел достаточно неожиданное применение в исследованиях внутримолекулярной подвижности больших белков. Разница в релаксации одноквантовой когерентности для двух различных спиновых состояний азота - мера той самой "интерференции" между двумя механизмами поперечной релаксации, как оказалось, напрямую зависит от параметров быстрых движений в молекуле (пс-нс диапазон). Эта разница была названа скоростью "кросс-скорелированной релаксации ^{1}H-^{15}N" (η_{xy}) и были разработаны эксперименты для ее измерения [299]. В настоящий момент, измерение кросс-скорелированной релаксации является общепринятым подходом при исследовании подвижности больших объектов. Поскольку, в случае крупных белков в отсутствие медленных движений η_{xy} коррелирует со скоростью поперечной релаксации R_2, этот параметр удобен для детекции регионов, в которых происходят медленные движения в диапазоне мкс-мс, а также для относительно быстрого измерения скорости вращательной диффузии белка как целого.

1.3.2. Оптимизация поперечной релаксации. Спектроскопия TROSY для алифатических и ароматических ^{13}C-^{1}H систем.

Достаточно быстро после появления первого эксперимента TROSY были предложены подходы для оптимизации поперечной релаксации CH и CH_3 групп. Эксперимент для ароматических CH был предложен Первушиным с соавторами уже в 1998 году [300], сразу же после публикации первой импульсной последовательности на основе TROSY. В отличие от амидных групп, для ароматических колец имеет смысл оптимизировать только релаксацию ^{13}C, из-за малой анизотропии химических сдвигов протонов, которая неспособна скомпенсировать диполь-дипольную релаксацию. Поэтому, в импульсной последовательности TROSY для ароматических колец осуществлялся выбор одной из двух компонент дублета в измерении ^{13}C и смешивание двух компонент дублета по протонам за счёт развязки. При этом, авторы предложили использовать детекцию с "постоянной задержкой" по ^{13}C (детекция по непрямому направлению спектра осуществляется не итеративным удлинением задержки между импульсами, а благодаря изменению положения 180-градусного импульса внутри постоянной задержки). Постоянная задержка приводит к отсутствию активных констант ^{13}C-^{13}C, которые в случае ароматических остатков существенно ухудшают качество спектров ЯМР, однако такой подход вызывает потерю чувствительности спектров из-за поперечной релаксации ^{13}C во время длительной задержки. TROSY позволяет скомпенсировать эти потери и выигрыш от использования оптимизации составляет от 4 до 10 раз для тотально меченых белков массой 14-

18 кДа. Указанный выигрыш можно существенно увеличить при использовании SAIL-мечения и частичного дейтерирования ароматических цепей. Примечательно, что оптимум TROSY-эффекта наблюдается уже на приборах с рабочей частотой по протонам 600-800 МГц, то есть на стандартном оборудовании, доступном большинству лабораторий в области ЯМР спектроскопии макромолекул. Новая версия импульсной последовательности TROSY-HSQC для ароматических остатков была предложена в 1999 году и позволяла увеличить чувствительность экспериментов ещё в 2 раза, за счёт использования более оптимального блока обратного переноса когерентности с углеродов на протоны [301].

К началу 2000х годов не возникало необходимости оптимизировать поперечную релаксацию метильных групп. В силу быстрого вращения вокруг CC' связи, метильные группы белков характеризуются наиболее медленной поперечной релаксацией и являются источником самых интенсивных сигналов в спектрах ЯМР белков массой вплоть до 50 кДа. Однако, с развитием методов селективного протонирования CH_3 групп появилась возможность регистрировать спектры ЯМР белков массой вплоть до 1 МДа, для которых оптимизация поперечной релаксации является уже выигрышной стратегией. В отличие от NH и ароматических групп, анизотропия химического сдвига вносит чрезвычайно малый вклад в поперечную релаксацию метильных групп, которая определяется исключительно диполь-дипольными взаимодействиями. Первые удачные попытки оптимизировать поперечную релаксацию метильных групп опирались на сложный анализ поведения всех элементов матрицы плотности на протяжении импульсных последовательностей [298]. В отличие от амидных групп, где можно рассмотреть всего два перехода для каждого из ядер, в случае CH_3 необходимо учитывать 10 переходов ^{1}H и 8 переходов ^{13}C [302]. На основе такого анализа, в 2003-2004 годах было показано, что наиболее медленная поперечная релаксация характерна для двухквантовой когерентности ^{13}C-^{1}H, которую можно селективно выбирать, используя эксперименты типа HMQC (Рис. 6). По сравнению со стандартными спектрами HSQC (детектируется одноквантовая когерентность), которые наиболее оптимальны для небольших белков, HMQC могут обеспечить выигрыш в чувствительности от 1.5 до 3 раз при условии тотального дейтерирования "фона" и низкого содержания метильных групп в белке массой 300 кДа. В более поздней работе было предложено использовать нуль-квантовую когерентность вместо двухквантовой [303]. При сохранении чувствительности такой подход (HZQC) позволяет улучшить разрешение спектров ЯМР метильных групп, из-за минимизации вкладов от ядерных спинов ^{1}H и ^{2}H из ближайшего окружения метильной группы. Однако, метод не получил распространения из-за сложности интерпретации получаемых спектров: вместо химического сдвига ^{13}C, как во всех остальных

экспериментах, в HZQC по непрямому направлению спектра детектируется разность частот Ω_C - Ω_H.

1.3.3. Новые датчики и эксперименты TROSY с детекцией по ^{15}N.

В силу базовых законов физики, чувствительность детекции спиновых переходов ядер при помощи ЯМР в первом приближении пропорциональна $\gamma_e\sqrt{(\gamma_d B_0)^3}$, где B_0 - напряженность внешнего магнитного поля, а γ_e и γ_d - гиромагнитные отношения для ядер, которые возбуждаются и детектируются в конкретном эксперименте. Максимальное гиромагнитное отношение наблюдается у протонов, что на долгое время обусловило развитие импульсных последовательностей и датчиков для ЯМР высокого разрешения. Подавляющее большинство экспериментов опираются на возбуждение и детекцию протонов, соответственно все датчики построены таким образом, что наивысшая чувствительность достигается именно при детекции ^{1}H. Однако, в последнее время все больше внимания уделяется прямой детекции гетероядер (ядер, отличных от протонов). Впервые выгода от детекции гетероядер была продемонстрирована для ^{13}C в случае несвернутых белков - ^{13}C характеризуются увеличенной дисперсией химических сдвигов, даже в случае неупорядоченных белков, а также устойчивостью к эффектам химического обмена, например обмена амидных протонов с растворителем, который приводит к существенному ухудшению качества спектров неструктурированных фрагментов белков при физиологических условиях [304]. Популярность исследований несвернутых белков после 2010 года привела к появлению в продаже инверсных криодатчиков, в которых максимально возможная чувствительность достигается для ^{13}C. Более того, в последние годы для больших белков была показана перспективность детекции ^{15}N, в особенности в отношении объектов большой массы [305], что было сопряжено с разработкой ^{15}N-детектируемых спектров TROSY. Несмотря на низкое гиромагнитное отношение (0.1 от γ_{1H}), что в теории должно привести к потере порядка 97% чувствительности, по сравнению с детекцией протонов, прямая детекция ^{15}N в больших белках позволяет получать существенный выигрыш по чувствительности за счёт оптимизации поперечной релаксации. В первую очередь, детекция азота позволяет существенно сократить импульсную последовательность, с 17 до 12 мс. Во-вторых, данный подход позволяет улучшить разрешение спектров, а также не чувствителен к дейтерированию белка. В случае полностью протонированного белка, поперечная релаксация ^{1}H будет определятся в основном диполь-дипольными взаимодействиями между протонами. Так, наличие CαH протона ускорит поперечную релаксацию амидного протона в 2.5 раза при использовании ^{1}H-TROSY и никак не

повлияет на релаксацию ^{15}N. В более поздней работе авторы показали, что при физиологической концентрации соли (200 мМ), ^{15}N-детектируемый эксперимент может обеспечить сопоставимую с классическим экспериментом TROSY чувствительность для недейтерированных белков массой порядка 50 кДа, а при более высоких концентрациях соли прямая детекция по азоту позволяет улучшить чувствительность в 3 раза и даже более [306] (Рис. 7). Стоит отметить, что несмотря на описываемые в оригинальных работах преимущества подхода, на настоящий момент в литературе можно найти только один пример успешного применения детекции ^{15}N, и тот относится к случаю неупорядоченных, а не массивных белков [307]. На взгляд автора, это объясняется существенно сниженной чувствительностью метода при работе с подавляющим большинством объектов, за исключением действительно экзотических молекул, недейтерированных белков массой свыше 50 кДа в растворах, содержащих более 300 мМ соли, работать с которыми пока предпочтительнее другими методами из-за дороговизны специализированных криодатчиков для ЯМР-спектроскопии. Сам по себе криогенный датчик в 2018 году может позволить себе далеко не каждая лаборатория (стоимость датчика - порядка 0.5 млн долларов США, стоимость ежегодного обслуживания - 30 тысяч долларов США). Покупка дополнительного датчика за 0.5 млн долларов ради возможности работы с экзотическими объектами в настоящий момент нецелесообразна.

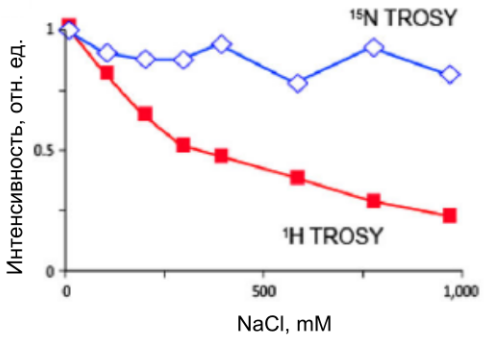

Рисунок 7. Зависимость интенсивности сигнала белка GB1 от концентрации NaCl в спектре ^{1}H-TROSY (красные точки) и ^{15}N-TROSY (синие точки) (рисунок воспроизведен из статьи [306]).

1.3.4. Оптимизация переноса поляризации - CRIPT, CRINEPT

До сих пор речь шла о методах оптимизации поперечной релаксации за счёт "интерференции" различных механизмов при выборе конечной намагниченности во время детекции. Однако, возможности для оптимизации экспериментов ЯМР, как оказалось, не ограничиваются детекцией. Так, одним из важнейших элементов всех гетероядерных импульсных последовательностей является блок переноса поляризации с протона на гетероядро

и обратно. В классических экспериментах, оптимизированных для небольших белков и низкомолекулярных соединений для этих целей используется скалярное спин-спиновое взаимодействие в блоках, которые называются INEPT (англ, Insensitive Nuclei Enhanced Polarization Transfer, улучшенный перенос поляризации на нечувствительные ядра) [308]. В ряде экспериментов используется кросс-поляризация - одновременное радиочастотное облучение двух ядер [309]. Одним из основных недостатков обоих методов является необходимость нахождения общей намагниченности образца в плоскости, перпендикулярной направлению магнитного поля, что приводит к потерям из-за поперечной релаксации. Для белка массой около 30 кДа типичная ширина линий протонов составляет 20-30 Гц, а длительность блока INEPT (^{1}H,^{15}N) - 5.6 мс, что приведет к потере около 40% интенсивности при переносе поляризации на азот. Для белка массой свыше 100 кДа потери из-за поперечной релаксации протонов во время переноса поляризации оказываются настолько высоки, что возможность детекции амидных групп в таких белках можно поставить под сомнение. Поэтому, еще в 1990х годах были предложены другие варианты переноса когерентности в амидных группах белков, которые были названы CRIPT (от англ. Cross-correlated Relaxation Induced Polarization Transfer, перенос поляризации, вызванный кросс-скорелированной релаксацией, [310]) и CRINEPT (англ Cross-correlated Relaxation enhanced Polarization Transfer, перенос поляризации, усиленный за счет кросс-скорелированной релаксациии [311]). Оба подхода использовали кросс-скорелированную релаксацию (интерференцию между диполь-дипольной релаксацией и анизотропией химического сдвига), которая применяется в классическом TROSY, не только при выборе финальной намагниченности, но и для переноса когерентности. В результате, было показано, что CRINEPT позволяет получать двухкратный выигрыш по чувствительности по сравнению со стандартным блоком INEPT для белков с временем корреляции вращательной диффузии (τ_C) от 50 до 300 нс (50 нс соответствует 80 кДа при 40 ºC).

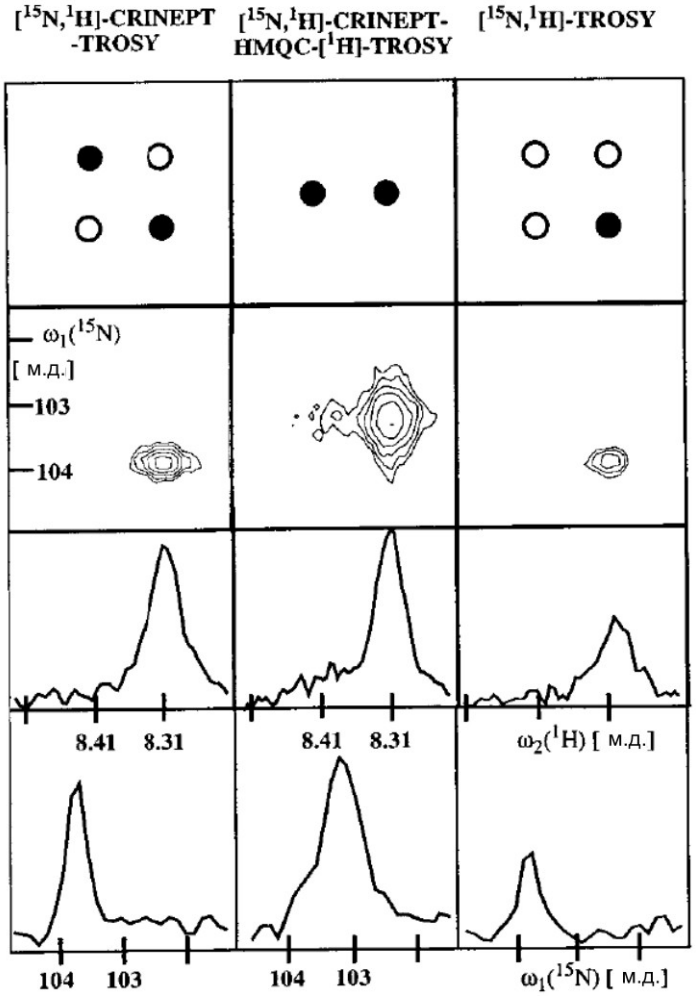

Рисунок 8. Сверху-вниз, алгоритм выбора намагниченности, вид кросс-пиков и срезы кросс-пиков двумерного спектра по направлениям 1H и 15N для спектров CRINEPT-TROSY, CRINEPT-HMQC и TROSY (вопроизведен из работы [311])

Стоит отметить, что в силу ряда причин методы на основе CRIPT/CRINEPT не получили широкого распространения. В первую очередь это связано с появлением подходов селективного протонирования и TROSY метильных групп, что позволило получать спектры высочайшего качества даже в белках массой свыше 1МДа [302]. Амидные группы зачастую участвуют в медленных движениях, уширяются из-за обмена протонов с растворителем и в целом характеризуются гораздо более быстрой поперечной релаксацией, чем метильные, что предопределило развитие методов спектроскопии ЯМР в последние два десятилетия. Тем не менее, в литературе можно встретить несколько относительно недавних примеров применения CRINEPT для изучения массивных объектов - в 2015 году эксперимент CRINEPT использовался для изучения взаимодействия белка тау с тубулином [312], а в 2018 году - для исследования структуры шаперонов внутренней мембраны митохондрий [313].

1.3.5. Оптимизация продольной релаксации и "быстрая" ЯМР-спектроскопия.

Поскольку ЯМР является сравнительно нечувствительным подходом, регистрация спектров осуществляется методом накопления - многократным повторением. С другой стороны, до последнего времени, процессинг спектров ЯМР осуществлялся с помощью алгоритма "быстрого преобразования Фурье", который требует заполнения полной матрицы Найквиста в непрямых направлениях спектра методом итеративного изменения специальных задержек на эволюцию химического сдвига в импульсных последовательностях. Таким образом, ключевым параметром, определяющим чувствительность экспериментов и затраты времени на получение многомерных спектров является так называемая задержка на релаксацию - время, которое прибор простаивает между последовательными накоплениями данных, чтобы дать системе вернуться в состояние равновесия. Эта задержка напрямую зависит от времени продольной релаксации ядер, возбуждаемых в процессе эксперимента. Если система релаксирует за в N раз более короткое время, можно чаще повторять импульсную последовательность, что увеличит чувствительность в $\sqrt{N}$ раз. Общая продолжительность эксперимента также является важным параметром по ряду причин, в первую очередь из-за высокой стоимости приборного времени. Дополнительно, возможность быстрого получения двумерных и трехмерных спектров может быть чрезвычайно полезной для так называемого "ЯМР в реальном в ремени" - исследований кинетики медленных процессов, например обмена амидных протонов белка на дейтерий растворителя. В силу перечисленных причин в последнее десятилетие происходит бурное развитие методов ЯМР, направленных на ускорение экспериментов ЯМР, либо за счёт новых методов преобразования спектров либо за счёт оптимизации продольной релаксации. Для больших молекул, в том числе МБ, такое ускорение позволяет существенно оптимизировать чувствительность, поскольку продольная релаксация становится максимально медленной именно в случае массивных объектов в мощном магнитном поле.

Начиная с 2002 года были предложены несколько эффективных методов для ускорения продольной релаксации протонов. Во-первых, добавление растворимых парамагнитных агентов приводит к возникновению "парамагнитного усиления релаксации". Этот эффект использовался ранее для регистрации одномерных спектров ^{13}C низкомолекулярных соединений, успешное применение для белков было впервые продемонстрировано в 2006 [314]. Одной из ключевых проблем является склонность парамагнитных агентов усиливать как продольную, так и поперечную релаксацию, что нежелательно. Авторы работы показали, что использование ионов никеля в комплексе с хелатирующим агентом DO2A позволяет в два раза сократить время

продольной релаксации амидных протонов при минимальном негативном эффекте на скорость поперечной релаксации протонов в экспонированных в водное окружение регионах белка. Примерно в то же время, был предложен подход с использованием ионов гадолиния и более специфичного хелатора DOTA, а также с использованием импульсных последовательностей, осторожно обращающихся с намагниченностью растворителя [315]. При умеренных концентрациях (0.5-1 мМ), Gd влияет исключительно на релаксацию растворителя, практически не влияя на поперечную релаксацию белка, что позволяет добиться усиления сигнала ЯМР на 20-25% в спектрах CRIPT шаперона GroEL, за счет диполь-дипольных взаимодействий между протонами белка и протонами растворителя, релаксация которых ускорена благодаря присутствию ионов Gd.

С другой стороны, наилучшим решением было бы избежать добавления дополнительных компонентов в образец для исследования и решить задачу оптимизации релаксации исключительно инструментами импульсной последовательности. Исторически первым подходом к оптимизации продольной релаксации было возбуждение части спинов, например, использование в начале импульсных последовательностей более коротких импульсов, чем стандартные, которые должны поворачивать намагниченность на 90 градусов. При этом, намагниченность поворачивается на меньший угол, что уменьшает интенсивность сигналов, но и уменьшает затраты времени на релаксацию системы. Во многих случаях существует оптимальный "угол" (длительность, соответствующая повороту намагниченности образца на определенный угол) импульса, позволяющий получить максимальную чувствительность эксперимента ЯМР [316]. Подход получил название "угол Эрнста" в честь лауреата Нобелевской премии 1991 г. Ричарда Эрнста и, как было показано впоследствии [317], его применение позволяет значительно улучшить чувствительность нескольких гетероядерных спектров ЯМР. Однако, можно добиться гораздо большей оптимизации, используя рациональное обращение с намагниченностью, которая не используется для детекции в эксперименте. Впервые это было продемонстрировано в 2002 году Константином Первушиным и соавторами [318], который предположил, что если неиспользуемую намагниченность сохранять вдоль направления внешнего магнитного поля после окончания импульсной последовательности, это может значительно ускорить продольную релаксацию возбуждаемых спинов, за счет диполь-дипольных взаимодействий. В случае классического спектра ^{1}H,^{15}N-TROSY-HSQC к неиспользуемой намагниченности относятся протоны растворителя, а также протоны алифатических цепей. Селективное возбуждение амидных протонов осуществлялось за счёт использования гетероядерных КССВ для протонов, связанных с ^{13}C, а также за счёт селективных

импульсов, возвращающих намагниченность воды в равновесное положение. Методика была названа LTROSY, и её применение позволило сократить оптимальную (соответствующую максимальной чувствительности) задержку между накоплениями более чем в два раза, с одной секунды до 300-500 мс, что соответствует приросту чувствительности в спектрах от 40 до 70%.

Позднее, в работе группы профессора Brutscher был предложен эксперимент $^{1}H,^{15}N$-SOFAST-HMQC (спектросокпия многоквантовой гетероядерной когерентности с оптимизированным углом импульса и диапазон-селективным возбуждением) [319]. В данной импульсной последовательности одновременно использовались два подхода к оптимизации продольной релаксации - угол Эрнста и селективное возбуждение амидных протонов с использованием радиочастотных импульсов особой формы (PC_9 [320], RSNOB [321]), которые способны избирательно манипулировать намагниченностью ядерных спинов, резонирующих в заданном диапазоне частот. SOFAST-HMQC характеризуется в три раза большей чувствительностью, чем стандартные эксперименты HSQC при задержке между накоплениями порядка 100 мс, поэтому использование экспериментов типа SOFAST позволяет проводить регистрацию двумерного спектра за 5с, что существенно меньше стандартного времени (5 минут), необходимого для получения нужного разрешения. При этом, оптимальная задержка на релаксацию составила около 500 мс, а максимальное увеличение чувствительности для белка 18 кДа (при оптимальных задержках на релаксацию) превысило 100% по сравнению с обычным HSQC и 30% по сравнению с LTROSY [322]. Более того, подобный подход был предложен и для метильных групп, однако выигрыш в чувствительности по сравнению со стандартными экспериментами не превысил 20%, поскольку продольная релаксация CH_3 групп в белках в первую очередь определяется движениями группы, и в гораздо меньшей степени - окружением [323]. Тем не менее, за счёт применения возбуждения импульсами под углом Эрнста авторам удалось в три раза уменьшить задержку на релаксацию без потери удельной чувствительности, получаемой за единицу времени продолжительности эксперимента.

Наконец, в 2006-2011 годах вышла серия работ, в которых был представлен подход BEST (диапазон-селективное возбуждение с короткой задержкой), опирающийся на использование селективных импульсов (Reburp [324], Eburp2 [324] и Pc_9 [320]) для аккуратных манипуляций с намагниченностью амидных протонов при сохранении равновесного состояния спинов остальных протонов белка и растворителя [325]. Авторы предложили набор из 11 импульсных последовательностей тройного резонанса (HNCO, HNcoCA, HNCA, HNcaCO, HNCACB, HNcoCACB, HNcocaCB, iHNCA, iHNcaCO, iHNCACB, iHNcaCB) [326], при этом усиление сигналов в режиме максимальной чувствительности составило всего 25% по сравнению со

стандартными экспериментами за счет оптимизации продольной релаксации. С другой стороны, при коротких задержках между последовательными накоплениями усиление сигналов могло достигать 180%. В 2011 году были представлены модифицированные импульсные последовательности BEST, в которых применяется оптимизация поперечной релаксации (TROSY) и дополнительная оптимизация продольной релаксации за счет использования равновесной намагниченности ядер азота [327]. Выигрыш от использования BEST-TROSY в спектрах тройного резонанса составляет 70% по сравнению с BEST-HSQC, поэтому в настоящий момент этот подход стал повсеместно применяться в исследованиях структуры белков при помощи ЯМР-спектроскопии. Усиление продольной релаксации за счет селективного возбуждения растёт вместе с размером молекул, однако практически вообще не наблюдается в случае полностью дейтерированных белков, поэтому подходы на основе BEST применяются для частично дейтерированных или недейтерированных глобулярных белков массой от 5 до 30 кДа. В дальнейшем, была показано, что BEST-TROSY является перспективным методом для получения спектров несвернутых белков [328]. Более того, использование подходов BEST для амидных протонов в связке с прямой детекцией углеродов в спектрах неструктурированных белков при физиологических значениях pH позволяет добиться феноменальной оптимизации продольной релаксации и усиления чувствительности за счёт быстрого обмена амидных протонов с растворителем [329].

Вторая тенденция последнего десятилетия в области "ускорения экспериментов" - разработка новых методов преобразования спектров ЯМР. Современная ЯМР-спектроскопия носит название импульсной спектроскопии преобразования Фурье. Регистрируются периодические осцилляции электромагнитного поля в образце, возникающие, в квазиклассическом приближении, из-за прецессии намагниченности ядерных спинов вокруг направления магнитного поля спектрометра. Затем, осцилляции поля, называемые спадом свободной индукции (ССИ) необходимо преобразовать в спектр - распределение характерных частот прецессии различных ядер образца, при помощи преобразования Фурье. Фурье-ЯМР был впервые предложен в 1970х годах [330], когда вычислительные мощности самых больших компьютеров были существенно ниже производительности современного мобильного телефона. Поэтому, единственно возможным алгоритмом для преобразования спектров ЯМР было быстрое преобразование Фурье. Данный алгоритм позволяет делать преобразование простым суммированием, в том случае если экспериментальные точки получены через равные промежутки времени (время ожидания), равные 1/SW, где SW - ширина захватываемого диапазона спектра в Гц. Трехмерная Фурье-спеткроскопия ЯМР, появившаяся в начале 1990х

годов опиралась на те же принципы, и для получения трехмерного спектра с минимальным разрешением 64*64 точек по непрямым направлениям требовалось сделать 8 (минимальное число повторений одной точки для фильтрации всех нежелательных компонент сигнала)*128*128=131072 повторений импульсной последовательности (для каждой точки требуется два повторения для регистрации действительной и мнимой части сигнала). При стандартном подходе оптимальная задержка на релаксацию между повторениями равна 1 секунде и регистрация одного трехмерного спектра потребует 36 часов. При этом четырехмерный спектр получить оказывается уже невозможным - затраты на регистрацию составят 192 дня. В силу перечисленных причин, начиная с 2000 года, когда вычислительные мощности существенно возросли, началась разработка методов преобразования спектров записанных в режиме неоднородной выборки - когда экспериментальные точки регистрируются не в виде регулярной матрицы на расстоянии 1/SW, а иным образом (случайным или по определенной схеме) [331]. Очевидно, что с точки зрения математики спектр ЯМР полученный по регулярной выборке является переопределенной системой уравнений - число экспериментальных точек в трех измерениях существенно превышает число кросс-пиков, поэтому можно предложить математические подходы для получения спектров из гораздо меньшего набора точек. Были разработаны несколько методов для такого "преобразования" Фурье, в основном это итеративные алгоритмы, минимизирующие некую функцию/величину. Не вдаваясь в историю, можно перечислить основные методы, получившие распространение в настоящий момент. В первую очередь это так называемый подход на основе "compressed sensing" (к сожалению, в русскоязычной литературе не нашлось адекватного перевода, можно предположить - усиленная чувствительность), в двух его основных модификациях. Суть метода сводится к предположению, что по большей части спектр ЯМР является "пустым" и содержит в основном нулевые точки. Первый алгоритм называется IRLS (англ. iterative reweighted least squares, итеративно перевзвешиваемые наименьшие квадраты) и сводится к минимизации нормы L_0 системы, что эквивалентно максимизации числа нулевых коэффициентов [332]. Метод демонстрирует отличные результаты при работе со спектрами, содержащими небольшое число сигналов при большой разреженности выборки (5-10%), однако плохо справляется с массивными спектрами ЯЭО, в которых содержатся тысячи сигналов. Другой подход называется IST (англ. iterative soft tresholding, итеративное мягкое отбрасывание точек) [333] и опирается на минимизацию L_1 нормы системы и решается методами обычного линейного программирования. IST приводит к худшему качеству реконструкции чем IRLS, однако работает быстрее, потребляет меньше памяти и с его помощью можно за разумное время получить преобразование массивных спектров, в том числе четырехмерных. Недавно было предложено

применить "принцип причинности" для обоих алгоритмов, использовать экспериментальные точки, полученные обращением времени (виртуальное эхо), что позволило существенно улучшить сходимость и уменьшить потребление вычислительных ресурсов [334]. Методы на основе compressed sensing, несмотря на то, что были впервые применены в ЯМР всего 5-6 лет назад, в настоящий момент внедрены во всем коммерческом программном обеспечении для обработки спектров.

Другим широко распространенным подходом является многомерная декомпозиция (ММД) [335]. Метод опирается на поиск форм линий сигналов в спектрах по трем измерениям и осуществляет одновременно и деконволюцию, и реконструкцию спектра. Сходимость подхода несколько медленнее и хуже при высокой разреженности выборки точек, чем у алгоритмов compressed sensing [336], однако встроенная в алгоритм деконволюция предоставляет ряд преимуществ. Так, при помощи ММД можно осуществлять со-процессинг спектров ЯМР, зарегистрированных с использованием одинаковых блоков импульсных последовательностей (то есть спектров, где в двух из трёх направлений будет наблюдаться одинаковые формы линий сигналов, например спектры тройного резонанса или HSQC и NOESY-HSQC). В этом случае, формы линий полученные для наиболее чувствительного эксперимента (например, HNCO), записанного с низкой разреженностью выборки, могут использоваться для анализа менее чувствительных спектров. Это позволяет улучшить сходимость реконструкции и осуществлять контролируемое накопление спектров с параллельным отнесением сигналов - процедуру, когда маленькими порциями по несколько точек записываются несколько спектров тройного резонанса, со-процессируются, из форм линий находятся положения пиков, проводится отнесение сигналов и в какой-то момент, когда качество отнесения перестаёт изменяться со временем, процедура прерывается и запускается следующий эксперимент. Другим применением со-процессирования можно указать времяразрешенную трехмерную спектроскопию, когда вместо серии коротких двумерных спектров, регистрируется длительный трехмерный эксперимент HNCO, а затем частями по несколько точек со-процессируется с полным спектром, что позволяет найти зависимость интенсивности сигналов от времени [337]. Похожий подход был разработан и для измерения релаксации/диффузии при помощи трехмерных экспериментов [338].

Отметим, что методы разреженной выборки позволяют не только экономить приборное время, но и оптимизировать чувствительность, что особенно важно для больших объектов. Делается это за счёт выбора правильной схемы выборки точек в непрямых направлениях спектра ЯМР [339]. Распределение точек можно проектировать с учётом параметров

релаксации, а также модуляции ССИ из-за КССВ, что позволяет получать больше накоплений с высоким отношением сигнал/шум (Рис. 9).

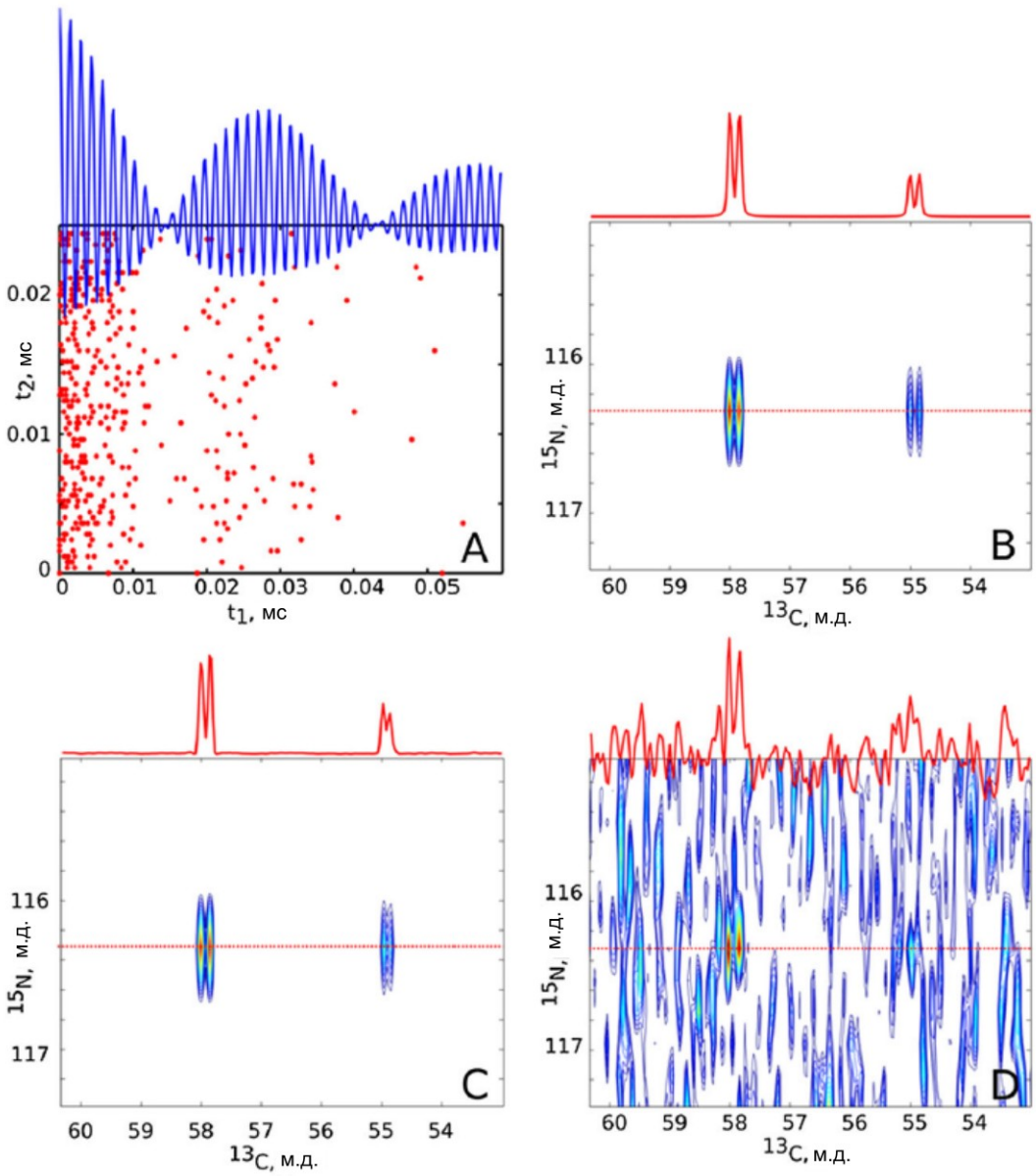

Рисунок 9 (воспроизведен из работы [336]). Оптимизация чувствительности спектров ЯМР за счет правильного распределения точек в выборке, для пары дублетов в симулированном спектре 3D HNCA. Спад сигнала наблюдается только вдоль измерения CA, с характерным временем 22 мс и модулирован функцией с частотой 35 Гц из-за КССВ ^{13}Cα-^{13}Cβ. **A** - схема сэмплирования (388 точек из начальной матрицы 400*62, разреженность 1.5 %) и модуляция ССИ по направлению CA. **B** - срез, полученный преобразованием полностью накопленного набора из 400*62 точек, без шума, **C** - срез, полученный преобразованием точек выборки на панели **A**, по алгоритму IRLS, с добавлением случайного шума; **D** - срез, полученный преобразованием всех 400*62 точек матрицы, с добавлением шума. Спектр на срезе **D** накоплен за то же время, что и спектр на панели **C**.

1.3.6. Новые методы определения пространственной структуры для изучения массивных объектов.

Все перечисленное выше касалось оптимизации разрешения спектров и релаксации сигналов для больших белков/нуклеиновых кислот. Однако, необходимость частичного или полного дейтерирования боковых цепей массивных объектов, требует разработки новых подходов и к определению их пространственной структуры. Классическая методика на основе спектроскопии ЯМР подразумевает использование контактов ЯЭО между протонами (которые недоступны в случае дейтерированного белка) и КССВ (которые невозможно измерить для больших белков из-за быстрой поперечной релаксации). В случае большого белка можно измерить ЯЭО между метильными группами и иногда между амидными протонами, а в качестве источника информации о двугранных углах вместо КССВ используют химические сдвиги. Способность химических сдвигов некоторых ядер предсказывать вторичную структуру белка продемонстрировали достаточно давно, на примере так называемых вторичных химических сдвигов - разницей между наблюдаемой величиной и средним значением для данного типа остатка в конформации "неупорядоченный клубок" [340]. Однако, в последние годы, в связи с активным применением ЯМР в отношении больших молекул, были разработаны точные методы предсказания двугранных углов φ, ψ и χ_1 по химическим сдвигам ядер аминокислотных остатков. Так, в 1999 году была представлена программа TALOS, которая использовала выверенную базу данных химических сдвигов белков для предсказания вторичной структуры [341]. При этом применяется ограниченный набор химических сдвигов, а также учитывается контекст в аминокислотной последовательности - данные о типах остатков в локальном окружении, а также об их химических сдвигах. Более поздняя модификация программы TALOS, TALOS+, с добавлением элементов искусственных нейронных сетей, анализирующих аминокислотную последовательность, позволила получать предсказания для 88% остатков белка с надёжностью свыше 97.5% [342]. Наконец, в 2013 года была предложена еще одна версия, TALOS-N, разработанная целиком на основе алгоритмов машинного обучения [343]. Несмотря на то, что общая точность не изменилась (90.7% остатков с надежностью 96.5 %), эта программа способна выдать существенно более узкие диапазоны при предсказании двугранных углов, что значительно улучшает сходимость при определении трехмерной структуры. К тому же, программа способна предсказать конформацию боковой цепи в среднем для 50% остатков, а для остатков с разветвлённой боковой цепью (Ile, Val, Thr) этот показатель растёт до 80%.

Помимо задачи предсказания двугранных углов белковой цепи, химические сдвиги можно использовать в качестве единственного набора данных для расчёта пространственной структуры небольших белков. Делается это с использованием алгоритма ROSETTA [344] (программы для генерации структур белка методом Монте-Карло) и алгоритма SPARTA+ [345] (программа для предсказания химических сдвигов по структуре белка). Программное обеспечение для таких приложений было названо CS-ROSETTA, его принцип работы следующий - структуры, сгенерированные модулем ROSETTA на основании гомологии и/или полуэмпирических потенциалов, затем ранжируются по соответствию предсказанных для них химических сдвигов экспериментально наблюдаемым и выбирается наилучшая конформация [346]. Точность полученных структур оставляет желать лучшего (**Рис. 10)**, но в условиях отсутствия возможности получения дополнительных данных такой подход может быть целесообразным для белков размером менее 130 остатков и зачастую использовался для определения структур МБ, как в растворе, так и методами ЯМР твердого тела [347–349].

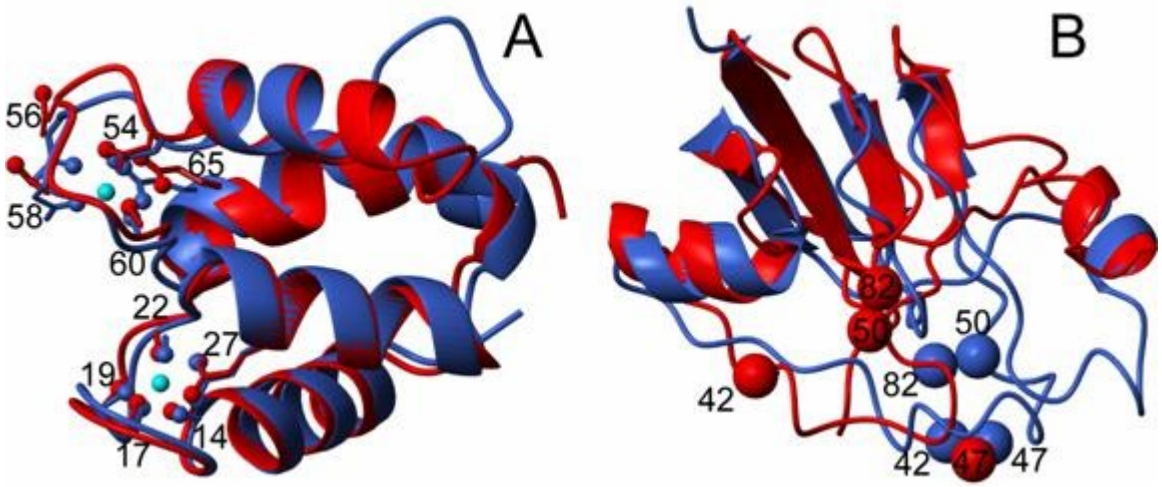

Рисунок 10. Пространственные структуры парамагнитных кальбиндина (A) и ферредоксина (B), полученные методом РСА (показаны синим) и с использованием CS-ROSETTA по химическим сдвигам ЯМР (красным). Рисунок воспроизведён из работы [346].

Программы типа TALOS позволяют определить вторичную структуру белка, в то время как для определения взаимного расположения элементов вторичной структуры и поверхностей их взаимодействия используются другие методы - контакты ЯЭО, спиновые зонды и остаточные константы диполь-дипольного взаимодействия (ОКДВ). Несмотря на то, что большие белки изучают в дейтерированной форме, можно наблюдать контакты ЯЭО, если получать селективно протонированные по метильным группам образцы (см. раздел 1.2.5) или осуществлять обратный обмен амидных протонов. При этом количество контактов ЯЭО оказывается малым и

недостаточным для точного определения пространственной структуры. Одним из подходов к преодолению данной проблемы является использование "точных ЯЭО" (eNOE) [350]. Стандартный подход подразумевает регистрацию спектра NOESY при одной задержке на смешивание с последующей калибровкой интенсивностей кросс-пиков для определения верхних ограничений на расстояния [226]. При этом учитывается зависимость интенсивности пика:

$$I \sim 1/r^6 \qquad (1),$$

где r - расстояние между протонами, а также среднее расстояние для определения константы калибровки. В результате получается большой набор ограничений, характеризующийся низкой точностью в силу разной скорости релаксации ядер белка. В серии недавних работ было предложено измерять спектры NOESY при нескольких значениях задержки на смешивание [351]. При этом можно избавиться от влияния продольной и поперечной релаксации, а также скорректировать спиновую диффузию (перенос намагниченности между далекими ядрами за счет наличия между ними другого ядра), используя итеративную процедуру уточнения пространственной структуры. Данный подход связан с большими затратами вычислительной мощности и приборного времени, однако, он позволяет получить набор сверхточных расстояний (ошибка 0.05 А), и это существенно улучшает сходимость структуры при ограниченном наборе расстояний, что было продемонстрировано на примере молекулы РНК и субъединицы протеасомы массой 360 кДа [352].

Другим способом измерять расстояния в больших белках являются спиновые зонды и парамагнитное усиление релаксации. Известно, что введение неподеленного электрона в виде стабильного радикала или иона переходного металла существенно усиливает поперечную релаксацию ядер в ближайшем окружении по закону, соответствующему выражению (1). Усиление релаксации можно измерить по уменьшению интенсивностей сигналов в спектрах ЯМР, а спиновый зонд можно ввести ковалентной модификацией остатков цистеина с использованием производных йодацетамида или метантиосульфоната [353]. Обычно в качестве спинового зонда используется нитроксильный радикал или хелатирующая группа на подобие DOTA с ионами редкоземельных металлов (Gd, Eu) [354]. Спиновые зонды неоднократно применялись для определения структур МБ, в том числе ДАГК [48], DsbB [53], сенсорного родопсина [64], протеородопсина [65], YgaA [73] и других белков [59]. Основными проблемами при использовании спиновых зондов являются сложность модификации целевого белка и подвижность зонда. Модификация по остаткам цистеина применима только для объектов, в

которых нет дисульфидных связей, а остатки цистеина обычно необходимо вводить методами точечного мутагенеза, при этом заменяя собственные цистеины белка. Не любой остаток можно безболезненно мутировать на цистеин, в некоторых позициях такая замена может вызвать нарушения в пространственной структуре и инактивацию, поэтому работы со спиновыми зондами требуют тщательного контроля за сохранением нативной структуры объекта. С другой стороны, спиновые зонды необходимо размещать в сравнительно стабильных участках белка, иначе высокая подвижность зонда не позволит точно оценить расстояния из-за усреднения по ансамблю [59]. Таким образом, две описанных проблемы накладывают ряд ограничений на положение мутируемого остатка и требуют внимательного контроля пространственной структуры, что существенно увеличивает затраты, как денежных средств, так и времени ученых.

Наконец, для уточнения структуры МБ можно использовать ОКДВ. Как известно, диполь-дипольные взаимодействия зависят от угла между вектором, соединяющим два диполя и направлением магнитного поля:

$$D_{IS} = -\frac{\gamma_I \gamma_S \hbar}{(2\pi r_{IS})^3}[1-3\cos(\theta)^2] \qquad (2),$$

где D_{IS} - диполь-дипольная константа для двух спинов IS, γ_I и γ_S - гиромагнитные отношения взаимодействующих спинов, r_{IS} - расстояние между ядрами, θ - угол между вектором r_{IS} и направлением магнитного поля спектрометра. В случае изотропного вращения среднее значение D_{IS} равно нулю, однако можно создать условия, в которых молекула белка будет двигаться достаточно анизотропно, чтобы возникали остаточные значения D_{IS}, равные:

$$D_{IS} = -\frac{\gamma_I \gamma_S \hbar}{(2\pi r_{IS})^3} \boldsymbol{B}\boldsymbol{A} \qquad (3),$$

где **A** - тензор молекулярной ориентации, а **B** - тензор движения. В итоге из тензора движения можно рассчитать в предположении жёсткой структуры ориентации векторов (например, NH) относительно молекулярной системы координат. Использование ОКДВ позволяет получить правильную взаимную ориентации ТМ α-спиралей, определить точки изгибов спиралей, а также описать внутримолекулярную подвижность белков [355]. Основной проблемой при использовании ОДКВ является создание анизотропной среды. Классические подходы опирались на использовании частиц, способных самопроизвольно ориентироваться в магнитном поле (вирусы, анизотропные бицеллы) [356], однако МБ, помещённые в мицеллы детергента, взаимодействуют с частицами такого типа. Поэтому, в отношении мембранных белков применяют такие среды, как сжатые/растянутые полиакриламидные гели [357],

нуклеотидные последовательности, способные к самоорганизации в нитевидные структуры [358]и др. Образцы белка, после измерения ОДКВ оказываются неприменимы для повторного использования для других экспериментов, что делает данный подход сравнительно дорогим. Величина ОДКВ сопряжена с параметром порядка, описывающим внутримолекулярную подвижность вектора, для которого проводится измерения и не могут описывать ориентацию векторов в подвижных участках, что, впрочем, справедливо и для других измеряемых величин ЯМР-спектроскопии, например контактов ЯЭО. В целом, ОДКВ сравнительно широко используются при исследовании структуры дейтерированных белков [359].

Резюмируя главу 1, можно заключить, что в настоящее время разработан обширный набор методов для работы с МБ при помощи спектроскопии ЯМР. Основными, пока что неразрешимыми проблемами при исследованиях МБ являются (1) ограниченность набора мембраноподобных сред, (2) отсутствие рационального подхода к выбору мембранного окружения, (3) проблемы с нативностью структур МБ при гетерологической продукции, (4) дороговизна изотопно-меченых компонентов культуральных сред для гетерологической продукции, (5) сложность в получении спектров ЯМР высокого качества для массивных объектов. Подходы к решению части из перечисленных проблем будут предложены в представленной работе.

Глава 2. Обзор Литературы. Методы измерения свободной энергии взаимодействия мембранных белков.

Пространственная структура - не единственный объект интереса в отношении мембранных белков. Функционально значимая подвижность, ансамбль состояний, энергия состояний и параметры межмолекулярных взаимодействий - вот те параметры поведения МБ, которые нужно изучить, для понимания механизма функционирования МБ. В частности, взаимодействие между ТМ доменами чрезвычайно важно для ряда клеточных рецепторов, имеющих 1 α-спиральный ТМ сегмент (МБ-1), например рецепторных тирозинкиназ, толл-подобных рецепторов и других. Указанные белки активны только в виде гомо- и гетеродимеров, при этом, ТМ домен играет важную роль в процессе активации - мутации в домене могут нарушать функционирование полноразмерного белка [360,361], некоторые рецепторы из класса МБ-1 можно ингибировать, добавив их собственные или специальным образом сконструированные ТМ пептиды [362,363]. Согласно последним данным, взаимодействия между ТМ доменами МБ-1 могут выступать в качестве мишеней при разработке лекарственных препаратов [2]. Следовательно, необходимы методы для количественной оценки стабильности димеров ТМ доменов белков в модельных мембранах. В настоящий момент разработаны несколько подходов: SDS-электрофорез, генетические тесты, ультрацентрифугирование, калориметрия. Ниже остановимся на сути подходов, их основных недостатках и преимуществах.

2.1 SDS-электрофорез

SDS-электрофорез является первым методом, который когда-либо применяли для оценки энергии димеризации мембранных белков [364]. Подвижность белка на SDS-электрофорезе определяется двумя параметрами - его зарядом (в первом приближении - числом молекул анионного детергента) и его массой. Мономеры и димеры α-спиральных МБ будут характеризоваться различной подвижностью в геле, и, при наличии методики оценки концентрации белка по интенсивности полосы, при помощи электрофореза можно измерять концентрацию белка в мономерной и димерной формы. Впервые такой подход был предложен еще в 1992 году при исследовании Гликофорина А (GpA) - белка с чрезвычайно высокой склонностью образовывать гомодимеры [364]. Авторы методом точечного мутагенеза показали,

какие позиции в аминокислотной последовательности ТМ домена GpA важны для специфической димеризации белка, тем самым осуществив картирование интерфейса взаимодействия между ТМ α-спиралями (Рис. 11). Впоследствии, SDS-электрофорез неоднократно применялся для анализа олигомеризации МБ, в том числе для подтверждения тетрамерной формы канала KcsA [22], пентамерной формы фосфоламбана [365], анализа олигомерных форм ТМ столбов белка LMP1 вируса Эпштейна-Барр [366] и пр., однако недостатки данного подхода очевидны.

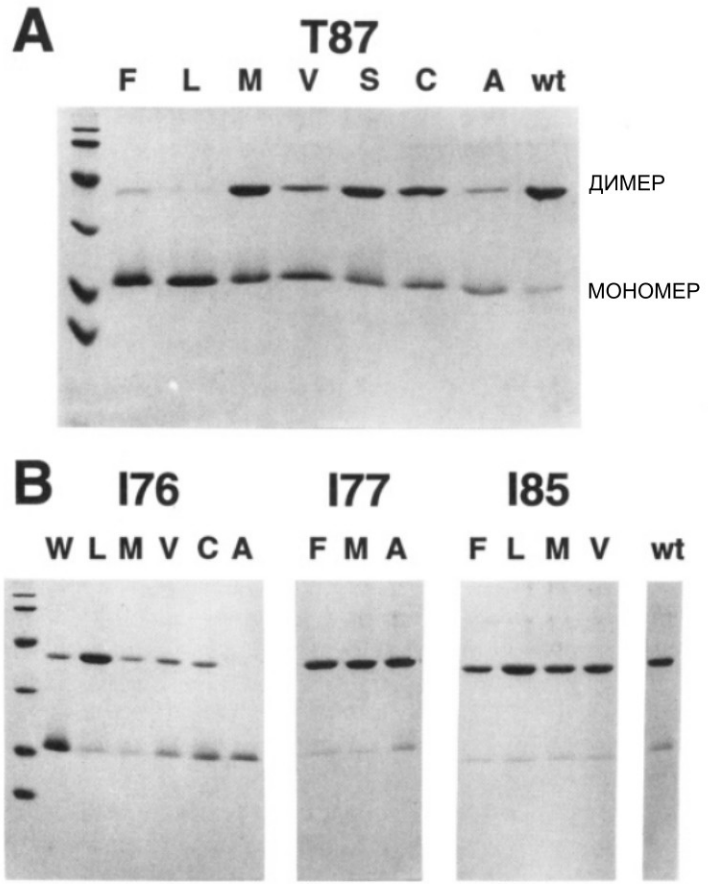

Рисунок 11. (воспроизведен из статьи [364]). Результаты гель-электрофореза для нескольких мутаций ТМ домена GpA в положении T87 (A), а также I76, I77 и I85 (B). Указано положение полос димера и мономера, слева в каждой панели - полоса маркеров молекулярной массы - 97.4, 66.2, 45, 31, 21.5, и **14.4 кДа.**

В первую очередь, SDS не является адекватной мембраноподобной средой. SDS - чрезвычайно жёсткий анионный детергент, и может денатурировать большинство мембранных белков, что ставит под сомнение биологический смысл результатов полученный в таком окружении. Во вторых, в случае быстрых переходов димер/мономер, МБ может не разойтись на две полосы и мигрировать единым фронтом с подвижностью, зависящей от концентраций белка

и детергента. В третьих, количественный анализ при помощи SDS-электрофореза осуществить практически невозможно, в силу сложностей с измерением концентрации. Большинство работ, выполненных при помощи данного метода, опираются на качественное сравнение.

2.2. Ультрацентрифугирование

В качестве количественного метода можно рассматривать аналитическое ультрацентрифугирование (АУЦ). Метод ультрацентрифугирования опирается на измерение зависимости концентрации белка от радиуса, соответствующего положению изучаемой части пробирки в центрифуге. Подход многократно использовался для определения массы белков, в том числе мембранных [367], с некоторыми модификациями он был приспособлен для измерения энергии димеризации ТМ домена GpA в 1997 году, по зависимости эффективной массы белка от концентрации [368]. Впоследствии, метод применялся для изучения димеризации ряда МБ в мицеллах детергентов [369–371]. Ограничения АУЦ также понятны - измеряется средняя "плавучая" масса частиц (англ. buoyant mass), которая складывается из массы белка и массы детергента за вычетом поправки на действие силы Архимеда. Соответственно, в общем случае для проведения исследования методами АУЦ, необходимо знать плотность частиц мембраноподобной среды, содержащих мономеры и димеры белка, а также плотность мономерного и димерного состояния. Поэтому, измерения АУЦ желательно проводить в детергентах, которые имеют парциальный объем молекулы, соответствующий нулевой "плавучей" массе. При использовании других детергентов, можно подстраивать плотность раствора под среднюю плотность мицеллы при помощи тяжёлой воды [372]. Поскольку плотность тяжёлой воды составляет 1.1 г/см^3, набор детергентов, которые можно использовать для АУЦ ограничен соединениями с парциальным объёмом от 0.9 до 1.0. Таким образом, оказывается, что наиболее широко распространённые мягкие детергенты (например, DDM и CHAPS) не могут применяться для анализа димеризации ТМ доменов методами АУЦ. При этом, проводить измерения можно в таких средах, как C_8E_5 [373,374], C14SB [369, p. 4] и DPC [375]. К недостаткам метода можно отнести трудоёмкость измерений, необходимость делать предположение о равной плотности мицелл с белком и без белка, а также равной плотности белка в мономерной и димерной форме, неприменимость метода к белкам в бицеллах и липосомах. Несмотря на то, что с помощью АУЦ проводился анализ сложных равновесий МБ (мономер-тример или даже равновесия между тремя олигомерными формами МБ) [371], достоверность таких исследований может вызывать сомнения в силу измерения всего одного параметра системы при ограниченном количестве точек по концентрации белка и при постоянной концентрации детергента.

2.3. Индуктивно-резонансный перенос энергии

Количественным методом измерения энергии димеризации белков является и индуктивно-резонансный перенос энергии флуоресценции (другое название - Ферстеровский резонансный перенос энергии флуоресценции, общепринятая англоязычная аббревиатура - FRET). Для анализа взаимодействий между белками при помощи FRET используют две флуоресцентные метки, спектр флуоресценции одной (донора) перекрывается со спектром поглощения второй (акцептора). В результате, по флуоресценции акцептора можно измерить среднее расстояние между метками, которое, в свою очередь, можно интерпретировать в терминах соотношения концентраций состояний димер/мономер. Впервые использовать FRET для измерения энергии взаимодействия МБ было предложено ещё в 1999 г, первые эксперименты проводились на GpA в мицеллах различных детергентов [376]. Впоследствии, измерения при помощи FRET для ряда белков были проведены в липосомах и даже в мембранах живых клеток [377,378]. По сути, FRET является единственным методом измерения энергии димеризации белков, который может применяться в любых мембраноподобных средах и мембранах, что является его неоспоримым преимуществом. Основных недостатков у метода два: (1) FRET чувствителен к среднему расстоянию между молекулами, а не к структуре, поэтому, если молекулы оказываются случайно сближены из-за высокой концентрации, отклик FRET будет невозможно отличить от специфической димеризации. Поэтому, FRET нельзя напрямую использовать для слабых димеров, в этом случаю требуется производить коррекцию на стохастическое распределение белков [379]. Поскольку детектируется только попарное среднее расстояние между метками, при помощи FRET будет сложно работать со сложным равновесием, когда одновременно присутствуют несколько олигомерных форм. (2) Для регистрации FRET белки необходимо модифицировать. Это можно сделать методами генной инженерии, создав химерные конструкции с флуоресцентными белками или же химически, при этом может оказываться влияние на собственную способность белка образовывать димеры. Белковые таги (например GFP) являются сравнительно большими и могут стерически препятствовать взаимодействию небольших ТМД, а большинство низкомолекулярных меток являются гидрофобными и могут встраиваться в мембрану, также нарушая димеризацию.

2.4. Изотермическая титрационная калориметрия

Метод изотермической титрационной калориметрии (общепринятая англоязычная аббревиатура - ITC) является наиболее "прямым", поскольку измеряется непосредственное выделение/поглощение тепла, происходящее за счёт взаимодействия между молекулами. Во

время эксперимента ITC при титровании объекта исследования поддерживают постоянную температуру и измеряют сопутствующие изменения теплоты в системе.

В случае димеризации водорастворимых белков при титровании происходит изменение концентрации белка, в случае МБ варьируется соотношение между концентрациями белка и липидов. Сам подход применяется достаточно долгое время, однако для мембранных белков он был модифицирован сравнительно недавно, в литературе пока можно встретить всего две работы [380,381]. Метод нельзя использовать в липосомах - при титровании не происходит обмена материей между везикулами и равновесие обычно не устанавливается. Поэтому, для ITC в качестве мембраноподобной среды обычно применяют фосфолипидные бицеллы сравнительно большого размера. Преимущества ITC очевидны - метод является прямым (измеряет энергию, а не концентрации) и позволяет получать информацию о термодинамических параметрах равновесия - энтальпии и энтропии взаимодействия. С другой стороны, при титровании образца концентрированным раствором бицелл, может появляться вклад в свободную энергию системы, вносимый липид-липидными взаимодействия при формировании частиц в растворе. К тому же, метод точно так же не способен работать со сложным равновесием, когда в растворе одновременно могут присутствовать более чем две формы белка.

2.5. Подходы на основе генной инженерии

Наиболее экзотический метод оценки способности ТМ белка образовывать димеры, который впоследствии получил широкое распространение, опирается на подход на основе генной инженерии. Методика использует активатор транскрипции ToxR, активность которого зависит от димеризации [382,383]. При этом создаётся химерная конструкция, содержащая ToxR, ТМ домен целевого белка (обычно изучаются битопные белки, содержащие одну α-спираль в ТМ домене), а также "периплазматический якорь", в качестве которого чаще всего используют мальтозосвязывающий белок (MBP). Химера ToxR-TM-MBP экспрессируется в E.Coli на сравнительно выском уровне, белок встраивается во внутреннюю мембрану бактерий, причём ToxR оказывается на цитоплазматической стороне мембраны. При этом в бактерию вводят некий репортерный ген, который находится под контролем промотора ctx, который активируется при взаимодействии с димером ToxR. По уровню экспрессии репортерного гена можно качественно оценивать и сравнивать способность ТМ доменов к димеризации. Было предложено несколько модификаций систем на основе ToxR. В течение долгого времени наиболее популярной системой являлась TOXCAT, где в качестве репортерного гена выступает

хлорамфениколацетилтрансфераза, а способность к димеризации оценивается по устойчивости колоний бактерий к хлорамфениколу [382]. Очевидно, что устойчивость бактерий к антибиотику - далеко не лучший критерий для количественного анализа, поэтому более поздние модификации методики использовали флуоресцентные белки в качестве репортерных генов - зеленый флуоресцентный белок GFP (система TOXGREEN [384]) и красный флуоресцентный белок mCherry (система TOXRED [385]). Преимущества систем на базе ToxR очевидны - это быстрый эксперимент, не требующий выделения и очистки белка, с простым способом измерения выходного сигнала. ToxR-системы могут применяться для серийного анализа взаимодействий между ТМ доменами [386,387], а также для высокопроизводительного скрининга потенциальных лекарств, действующих на димеризацию ТМ доменов [366]. Однако, к получаемым данным следует относиться с большой осторожностью. Размер ТМ домена, который можно клонировать в химерную конструкцию для измерения способности к димеризации слишком мал, и он обычно не включает заряженные остатки, которые фланкируют ТМ сегмент в нативном белке. С другой стороны, активация ToxR зависит от взаимной ориентации ТМ спиралей, поэтому, чтобы получить достоверные данные необходимо проверить все возможные положения ТМ сегментов относительно внемембранных доменов химеры, что делается за счёт тестирования четырёх различных конструкций, где вставка ТМД осуществляется в различных позициях с шагом в один а.о. [383,388]. В большинстве работ этот трудоёмкий анализ не проводится, поэтому методы на основе ToxR чаще всего описывают способность белка к димеризации в одной конкретной ориентации. Димеризация это всегда процесс, зависящий от концентрации молекулы, поэтому для точного анализа необходимо оценивать и уровень экспрессии химеры, который может меняться из-за мутагенеза, а ещё более правильным подходом будет исследование зависимости отклика системы от концентрации химерного белка. Такой эксперимент значительно усложняет исследование и чаще всего не проводится в современных работах, что снижает точность и надёжность получаемых данных. Наконец, поскольку ToxR активен только в виде димера, возможность олигомеризации целевого белка может повлиять на результат исследования при помощи ToxR-систем непредсказуемым образом. Большинство работ предполагают, что олигомеризация ТМ доменов должна приводить к усилению выходного сигнала, однако это не та гипотеза, которую можно назвать самоочевидной.

Резюмируя главу 2, можно заключить, что на настоящий момент разработаны несколько методик для измерения свободной димеризации МБ, каждая из методик имеет свои преимущества и свои недостатки. Большинство подходов (за исключением FRET и Tox-систем)

могут работать только в мембраноподобных средах с частицами малого размера (мицеллах и бицеллах), при этом FRET и Tox-системы требуют модификации целевого белка. Все подходы (кроме Tox-систем и SDS-фореза) измеряют сигнал, который соответствует некому среднему параметру структуры белка - например, среднюю молекулярную массу, среднее расстояние между флюоресцентными метками и т.д., что не позволяет достоверно работать со сложными равновесиями. В рамках настоящей работы предлагается рассмотреть ЯМР-спектроскопию в растворе в качестве метода измерения энергии димеризации МБ. В случае медленных переходов между олигомерными формами белка (разница химических сдвигов существенно больше суммы приведённых констант скоростей димеризации и диссоциации), ЯМР регистрирует не среднее расстояние, а отдельные конформационные состояния. Поэтому, даже при сравнительно слабой димеризации, при помощи ЯМР-спектроскопии можно будет измерить заселённости различных олигомерных состояний, случайная сближенность за счёт высокой концентрации не будет оказывать влияния на получаемые данные. С другой стороны, ЯМР позволяет глубоко вникнуть в физические принципы взаимодействия между ТМ доменами - при помощи метода можно не только измерять концентрации белка в различных состояниях, но и исследовать равновесную кинетику переходов между формами, что позволяет изучить параметры переходных состояний. Разработке методов измерения термодинамических и кинетических параметров димеризации будет посвящена существенная часть настоящей работы.

Глава 3. Краткая характеристика объектов исследования.

В силу ряда причин основными объектами настоящего исследования, для которых проводится разработка методик изучения структуры, внутримолекулярной подвижности и параметров межмолекулярного взаимодействия являются так называемые "Мембранные белки I типа" или битопные белки (МБ-1). На сегодняшний день существует множество различных классификаций МБ, основанных на их структуре и функции, при этом нельзя сказать, что есть официальный подход к классификации, зарегистрированный в каком-либо международном сообществе. Одна из классификаций опирается на топологию МБ, при этом интегральные МБ подразделяются на три типа [389]:

1. Белки первого типа имеют один ТМ сегмент (битопный белок), при этом N-концевая часть расположена вне клетки, а С-конец в цитозоли.

2. Белки второго типа также имеют один ТМ сегмент, но N-концевая часть расположена в цитозоли клетки.

3. Белки третьего типа являются политопными - имеют несколько ТМ сегментов, которые пронизывают насквозь клеточную мембрану.

Битопные белки достаточно сложно исследовать экспериментально. Их внемембранные домены обычно характеризуются большим размером и достаточно подвижны относительно ТМ сегмента. В силу данной особенности, до сих пор не получено ни одной кристаллической структуры полноразмерного МБ-1, или фрагмента МБ-1 содержащего ТМ домен в связке с любым другим доменом белка. С другой стороны, опубликованные на текущий момент работы, выполненные с использованием криоэлектронной микроскопии, характеризуются чрезвычайно низким разрешением полученных карт электронной плотности (3-4 нм [390]), в силу высокой конформационной гетерогенности образцов. Таким образом, ЯМР-спектроскопия высокого разрешения является чрезвычайно перспективным методом для изучения структуры как ТМ частей МБ-1, так и более крупных фрагментов белков содержащих несколько доменов.

Среди МБ-1 можно выделить несколько основных классов объектов, при этом большинство битопных белков являются клеточными рецепторами. В первую очередь это рецепторные тирозинкиназы (РТК). РТК являются рецепторами гормонов и факторов роста, в человеческом организме экспрессируются 58 различных РТК, которые подразделяют на несколько подсемейств. Значимость РТК определяется их ролью в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток, что напрямую связано с развитием онкологических заболеваний [391]. В настоящей работе изучаются РТК семейства EGFR/HER (рецепторы фактора роста эпителия), VEGFR (рецепторы факторов роста сосудистого эндотелия), Trk (тропомиозиновые киназы, рецепторы фактора роста нейронов). Вторым классом объектов работы являются толл-подобные рецепторы (TLR). TLR - ключевые участники системы врождённого иммунитета, распознают характерные молекулы патогенов (дцРНК вирусов, липополисахариды и фрагменты пептидогликанов клеточных стенок бактерий и пр) и активируют иммунные клетки [392]. Нарушения в работе TLR могут приводить к аутоиммунным заболеваниям, TLR могут выступать мишенями для противовоспалительных препаратов [393]. Ещё одним рецептором, который будет изучаться в рамках работы является рецептор нейротрофинов p75. Данный белок принадлежит к семейству рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR) и активируется в ответ на связывание фактора роста нейронов (NGF) [394].

Все перечисленные белки активны в виде гомо- или гетеродимеров, причём их ТМД важны для работы полноразмерного белка. Так, ТМД рецепторов EGFR/HER, TLR, VEGFR, как было показано, способны к димеризации в отсутствие вне- и внутриклеточных доменов [395–397], а мутации в ТМ доменах могут влиять на активность рецептора. Замены гидрофобных остатков в ТМ спиралях на сильно полярные аминокислоты (Gln, Glu, Arg) могут приводить к лиганд-независимой активации рецепторов HER и VEGFR и трансформации клеток в опухолевые [360,361,398,399], а замены слабополярных остатков с малой боковой цепью (Gly, Ala, Ser) на объёмные аминокислоты (Leu, Val, Ile) могут приводить к инактивации некоторых рецепторов [400]. Наконец, для EGFR было показано, что пептид, соответствующий ТМ домену рецептора, при добавлении в культуру клеток, может ингибировать активацию полноразмерного белка [362]. Отдельно стоит упомянуть рецептор p75NTR, поскольку его ТМ домены образуют межмолекулярную ковалентную связь за счет образования дисульфидного мостика между остатками Cys257 (в случае p75 крысы) [401]. При этом, замена Cys257/Ala приводит к полной неспособности рецептора запускать внутриклеточные сигнальные пути в ответ на связывание лигандов.

На настоящий момент для рецепторов являющихся МБ-1, предложены несколько потенциальных механизмов активации. Наиболее широкое распространение в литературе получил механизм лиганд-индуцированной димеризации (ЛИД) [402]. В соответствии с ЛИД, в неактивной форме МБ-1 существует на поверхности клеток в виде мономеров, связывание лиганда (а лиганды сами зачастую являются димерами) вызывает взаимодействие внеклеточных доменов, димеризацию трансмембранных и активацию внутриклеточных доменов, которые запускают каскад передачи сигнала в ядро клетки. В случае РТК, активация внутриклеточных доменов приводит к фосфорилированию киназного домена, который после этого может взаимодействовать с белками-посредниками внутриклеточных каскадов. В случае TLR, взаимодействие внутриклеточных доменов инициирует сборку внутриклеточного комплекса эффекторных белков - миддосомы [403]. Другой механизм называется моделью "сопряженного вращения" (СВ) [404]. Основанием для выдвижения гипотезы о механизме СВ послужило открытие, что в неактивном состоянии, в отсутствии лиганда, многие рецепторы МБ-1 могут существовать в состоянии димеров [405]. Иными словами, должно существовать два димерных состояния рецепторов - активное и неактивное. Тогда в неактивном состоянии белок будет находиться в равновесии димер-мономер, а при связывании лиганда произойдёт изменение конформации трансмембранных и внутриклеточных доменов в димере, что приведёт к активации рецептора. Однозначно показано, что механизм СВ реализуется в случае многих

PTK (VEGFR [400], EGFR/HER [404,406], FGFR [407]), а также в случае p75NTR (который является ковалентным димером как в активном, так и в неактивном состоянии [401]). Для p75NTR механизм получил название "щипцы для улиток" (англ. snail tong), в соответствии с ним в неактивном состоянии внеклеточные домены расталкиваются, что приводит к ассоциации внутриклеточных доменов рецептора, в то время как при связывании NGF проходит димеризация внеклеточных доменов и диссоциация внутриклеточных (Рис. 12). TLR, как считается, работают по механизму ЛИД.

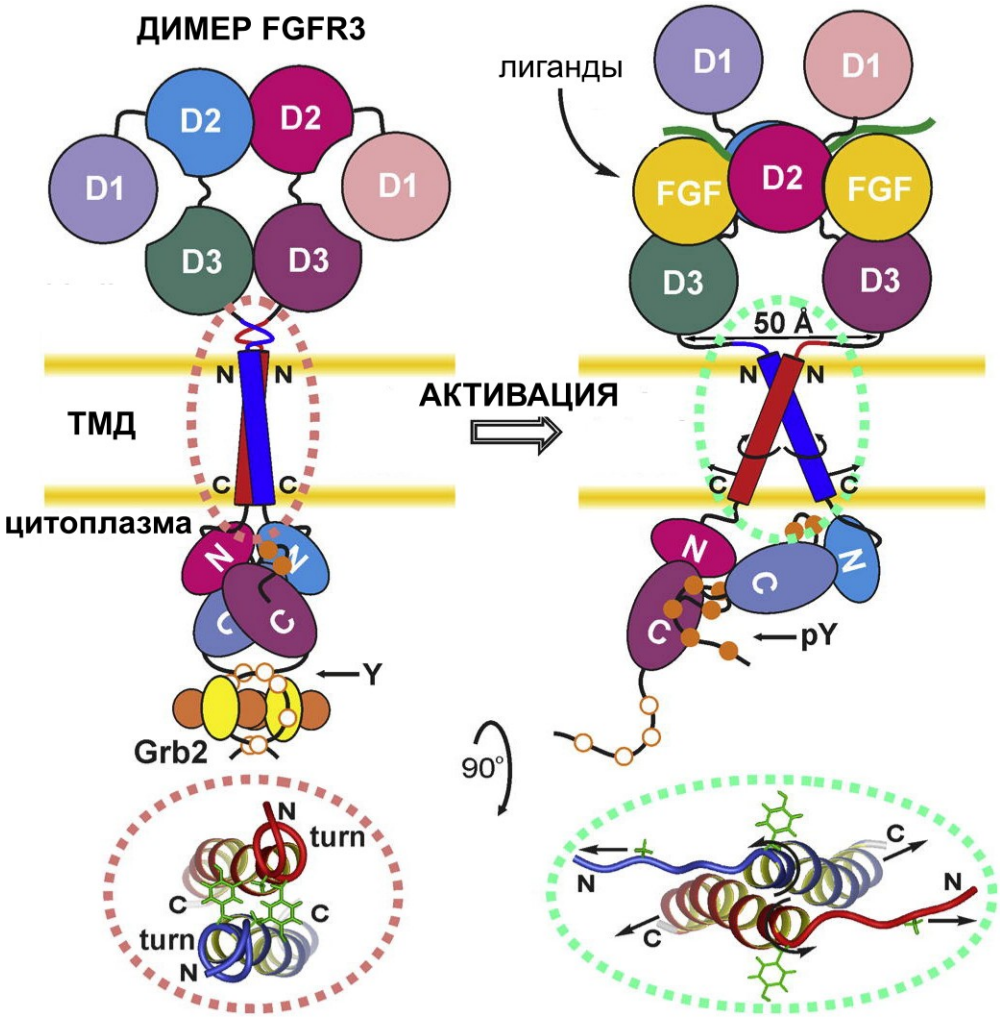

Рисунок 12. Модель "сцепленного вращения", предложенная Бочаровым Э.В. в 2013 г. для рецепторной киназы FGFR3, рисунок воспроизведен из работы [71], данные о структуре ТМ домена получены с использованием методов, разработанных в том числе в рамках данной работы. Слева - неактивное состояние без лиганда с симметричной структурой внутриклеточного домена и регуляторным белком Grb2 в комплексе с С-концевыми участками. Справа - активное состояние в комплексе с фактором роста фибробластов (FGF) и гепарином, киназные домены образуют асимметричный димер и фосфорилируют друг друга.

Стоит отметить, что при "сцепленном вращении" важную роль играют цитоплазматические примембранные регионы белков (ЦПР) [406]. В случае EGFR/HER было показано, что ЦПР при активации меняют свою структуру и образуют симметричный димер [108,408]. В случае же p75NTR, ЦПР содержат так называемый "чоппер" - домен, который взаимодействует с рядом адаптерных белков и может запускать внутриклеточный сигнальный каскад даже при делеции глобулярного "домена смерти" p75 [409,410].

Отдельно среди объектов работы следует упомянуть Гликофорин А - белок (антиген-представляющий белок мембраны эритроцитов), известный своей способностью образовывать гомодимеры, устойчивые даже в присутствии жестких детергентов [411]. В настоящей работе Гликофорин А используется в качестве объекта для отработки методов исследования пространственной структуры.

Таким образом, в силу сказанного выше очевидно, что если рецептор работает по механизму СВ, роль его ТМ домена значительна - он должен образовывать две различных димерных структуры, переключение между которыми должно приводить к активации/инактивации всего белка. Пространственная структура этих двух форм ТМ домена чрезвычайно важна, для глубокого понимания основ механизма активации рецепторов и нужна для создания лекарственных средств, направленно воздействующих на мембранную часть белков. Принципиальная возможность разработки таких препаратов была показана в серии недавних работ. Информация о свободной энергии димеризации ТМ доменов необходима для объяснения эффекта мутаций в ТМ доменах, а также для изучения зависимости свойств ТМ доменов МБ-1 от параметров липидного окружения. При этом, стоит отметить, что на момент начала работы в литературе присутствовала только одна структура димера ТМ доменов битопного белка (Гликофорина А), и та была получена в мицеллах детергента DPC [43], а её качество вызывало сомнения. Таким образом, назрела острая необходимость в разработке методов исследования димеров ТМ доменов МБ-1, а также более крупных фрагментов белков, содержащих ТМ домен. Основываясь на описанной проблеме, были сформулированы цели и задачи настоящей работы.

Глава 4. Разработка методов анализа свойств мембраноподобных сред, параметры малых изотропных бицелл различного состава.

Мембраноподобная среда - важнейший элемент при исследовании пространственной структуры МБ. Если относительно свойств мицелл детергентов на момент начала работы имелась определённая ясность, то параметры фосфолипидных бицелл малого размера были изучены фрагментарно, в литературе присутствовало небольшое количество противоречивых данных, которые касаются исключительно одного из возможных составов, DMPC/DHPC. Отметим, что под бицеллами малого размера понимают частицы, пригодные для исследования встроенного в них МБ посредством ЯМР-спектроскопии в растворе, то есть их радиус не должен превышать 4.5-5 нм. Так, к 2014 году удалось измерить размер бицелл DMPC/DHPC с соотношением q=0.5 несколькими методами - при помощи малоуглового рассеяния нейтронов [101] , ДСР [86] , а также крио-электронной микроскопии [84]. Это позволило заключить, что радиус бицелл DMPC/DHPC q=0.5 составляет от 3 до 4.5 нм (в зависимости от концентрации, температуры и использованных методов измерения). Дополнительно, было показано, что бицеллы увеличиваются при разбавлении, а при определённых концентрациях размер бицелл может зависеть от температуры - увеличиваться при нагревании [86]. Наконец, с использованием ^{31}P ЯМР, удалось измерить концентрацию детергента в растворе (не в составе бицелл) при различных отношениях q [105]. Ряд экспериментов был проведён для бицелл, содержащих белок - было показано, что в смеси q=0.5 DMPC/DHPC в присутствии белка внешней мембраны митохондрий OmpX, контакты ЯЭО возникают исключительно между ядрами белка и фосфолипида с длинной боковой цепью, в ближайшем окружении МБ не наблюдается существенного количества детергента [89]. С другой стороны в присутствии α-спирального белка (интегрина αIIβ) в бицеллах q=0.3 POPC/DHPC с использованием методов переноса насыщения было показано, что детергент все же может находиться вблизи белка, хоть и в меньших количествах, чем липид [106]. Очевидно, что указанной информации недостаточно для рационального подбора параметров мембраноподобного окружения при исследованиях структуры МБ, а также для понимания границ применимости малых бицелл различного состава. Есть ряд чрезвычайно важных вопросов, которые остались неотвеченными, а именно:

1. Какова на самом деле структура бицелл - наблюдается ли сегрегация липидов и детергентов и образование плоского участка липидного бислоя, или же бицеллы на

самом деле являются частным случаем сферических или эллиптических смешанных мицелл ?

2. Как размер бицелл зависит от состава смеси и параметров окружающей среды?
3. Как изменяется размер бицелл при встраивании ТМ домена целевого белка?
4. Как упакованы липиды в бицеллах, наблюдаются ли фазовые переходы?
5. Какие липиды и детергенты можно использовать для приготовления бицелл?
6. Какие свойства липидного бислоя можно воспроизводить при помощи бицелл за счёт изменения состава смеси?

В связи с перечисленными вопросами, в рамках настоящей работы была поставлена задача по разработке методов изучения структуры бицелл и исследованию поведения различных составов.

4.1. Модель идеальной бицеллы

Можно предложить несколько способов исследования структуры бицелл. В первую очередь это измерение радиуса частиц в зависимости от соотношения липид/детергент, q, и исследование фазовых переходов липидов. Основные вопросы на которые необходимо ответить при исследовании структуры малых бицелл - присутствует ли в этих частицах участок липидного бислоя и какова форма обода. В теории, измерение зависимости размера бицелл от соотношения q может предоставить ответ на оба вопроса, достаточно лишь сопоставить полученную зависимость с предсказанной, предполагая отсутствие смешивания липидов и детергентов. Такую зависимость называют "моделью идеальной бицеллы". Вывести выражение можно основываясь либо на соотношении площади молекул липидов и детергентов на поверхности бицеллы, либо на соотношении объёмов молекул:

$$q' = \frac{[Lip]}{[Det]-[Det]_f} = \lambda \frac{V_{disk}}{V_{rim}} = k \frac{S_{disk}}{S_{rim}} \qquad (4),$$

где q' = эффективное соотношение липид/детергент с учётом того, что часть детергента находится в растворе в мономерной форме (далее для простоты во всех формулах вместо q' будем использовать q), [Lip] и [Det] - молярные концентрации липидов и детергентов, $[Det]_f$ - концентрация детергента в растворе в мономерной форме, V_{disk} и V_{rim} - объёмы плоской части и обода бицеллы, а S_{disk} и S_{rim} - общая площадь поверхности диска и обода бицелла. При этом

параметры λ и k - описывают отношение объемов молекул (детергента к липиду) или площадей, приходящихся на одну молекулу детергента и липида на поверхности бицеллы.

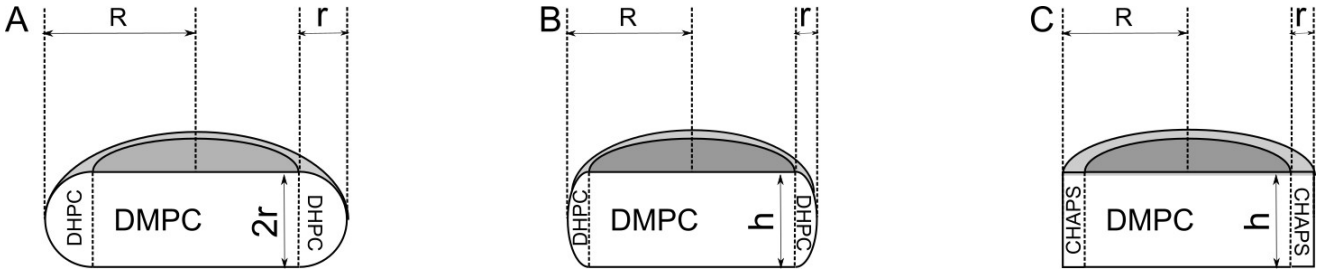

Рисунок 13. Модели идеальной бицеллы. **A** - модель с торроидальным ободом [98]. **B** - модель с ободом в виде эллиптического полутороида [99]. **C** - модель с цилиндрическим ободом, предлагаемая для бицелл DMPC/CHAPS.

Первая модель идеальной бицеллы была предложена для смесей DMPC/DHPC в 1996 году [412] , опиралась на отношение площадей поверхности частей бицеллы и предполагала, что обод имеет форму правильного полутороида (Рис. 13A), то есть толщина обода равна половине толщины бислоя, а k=1:

$$R=r+\frac{1}{2}rq\left[\pi+\sqrt{\pi^2+\frac{8}{q}}\right] \qquad (5),$$

где R - радиус бицеллы, а r - радиус обода (принимался равным 2 нм). Эта модель использовалась для оценки "идеальности" анизотропных частиц, однако, оказалась неспособна описать зависимость размера бицелл от q, измеренную методом ДРС для смесей с q от 0.5 до 2.5 [98], предсказывая размер существенно выше наблюдаемого. Для того, чтобы модель удовлетворяла экспериментальным данным ее скорректировали, предположив, что в то время как липид занимает 0.6 нм^2 на поверхности диска, как в бислоях [413], детергент будет занимать 1 нм^2 на поверхности обода, как в мицеллах DHPC [414,415], получив следующее выражение:

$$R=r+\frac{1}{2}rkq\left[\pi+\sqrt{\pi^2+\frac{8k}{q}}\right] \qquad (6),$$

где k-отношение площади головки DHPC к площади головки DMPC, при этом уравнение (6) идеально аппроксимировало измеренные радиусы, однако в ряде последующих работ наблюдали определённые расхождения, которые объясняли смешиванием липидов и детергентов в планарной области бицелл [98]. Например, для частиц с q=1 был при помощи ДСР был получен радиус равный 4.1 нм, что существенно меньше, чем 9.3 нм в соответствии с уравнением (6).

С другой стороны, очевидно, что выражение 6 не может быть верным, поскольку радиус обода r, равный 2-2.5 нм существенно превышает длину молекулы DHPC (1.2 нм). Следовательно, обод должен иметь форму эллиптического, а не сферического полутороида. Площадь поверхности на головку - также не лучший параметр, поскольку для DHPC в ободе бицеллы она неизвестна и никак не может быть измерена. Учитывая вышесказанное, в 2005 году была предложена модель идеальной бицеллы, основанная на отношении молекулярных объемов липида и детергента λ и предполагающая эллиптическую форму обода DHPC (Рис. 13B), которая, как сейчас считают, наилучшим образом описывает размеры частиц DMPC/DHPC [99]:

$$R = r + \frac{rq}{4\lambda}\left[\pi + \sqrt{\pi^2 + \frac{32\lambda}{3q}}\right] \qquad (7).$$

Уравнение (7) позволяет аппроксимировать размер бицелл DMPC/DHPC q=1, с параметрами r = 1.1нм, а λ = 0.6, что соответствует нашим представлениям о характеристиках молекул DMPC и DHPC. В рамках настоящей работы будут исследованы свойства бицелл, сформированных другими детергентами, в том числе производными холиевой кислоты CHAPS и CHAPSO (Рис. 14). CHAPS и CHAPSO - первые детергенты для которых наблюдали формирование анизотропных бицелл, однако впоследствии, после публикации бицелл DMPC/DHPC, о них забыли, как считает автор, незаслуженно. Дело в том, что CHAPS и CHAPSO являются гораздо более мягкими детергентами, чем DHPC и могут лучше подходить для исследования белков с глобулярными водорастворимыми доменами. Эти молекулы являются "плоскими амфифилами" - они имеют две выраженных плоских поверхности с существенно разными свойствами - полярную и неполярную. Они не могут образовывать мицеллы, как DHPC, где детергент упакован по принципу "голова к голове, хвост к хвосту" [416], а в бицеллах, как считается, плоские амфифилы образует цилиндрический обод, прикрывая гидрофобные хвосты липидов своей неполярной стороной. Для цилиндрического обода можно вывести следующее выражение (модель идеальной бицеллы):

$$R = r\left[1 + \frac{q}{\lambda} + \frac{\sqrt{q(q+\lambda)}}{\lambda}\right] \qquad (8).$$

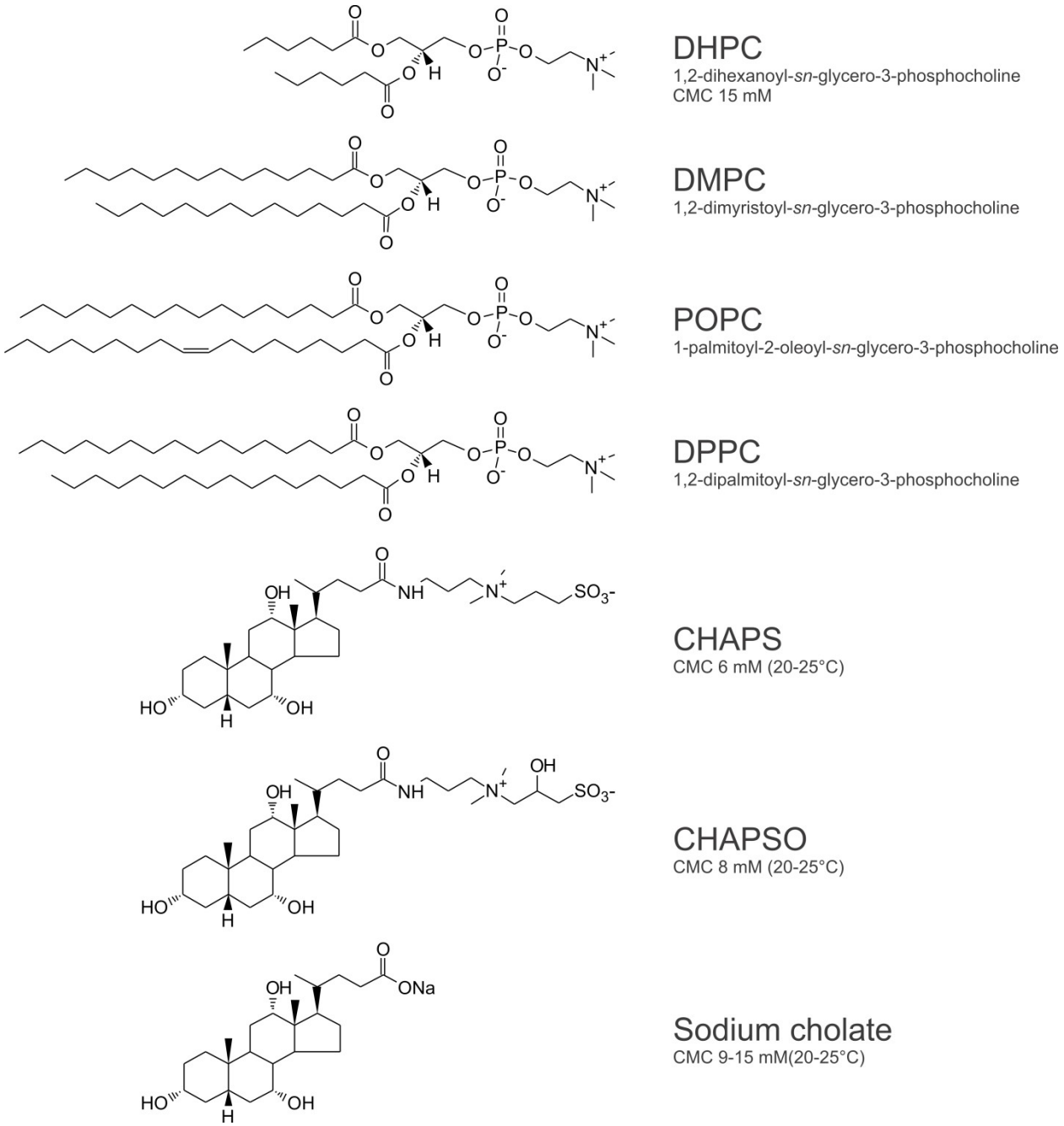

Рисунок 14. Структуры и общепринятые англоязычные названия некоторых использованных в работе липидов и детергентов (с указанием ККМ).

4.2. Разработка методики измерения размера бицелл

Имея выражения (7) и (8), описывающие идеальные бицеллы с различной формой обода, необходимо провести достоверные измерения зависимости радиуса частиц от соотношения q. В литературе можно встретить несколько попыток измерения радиуса бицелл при помощи малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН), ДСР и ЯМР, причём все работы приводят

различные значения гидродинамических радиусов (например, от 3 до 8 нм для бицелл q=0.5 DMPC/DHPC). Этому можно предложить несколько объяснений. Во-первых, бицеллы характеризуются сложной фазовой диаграммой и могут менять размер в зависимости от температуры и общей концентрации липидов [83,84]. Во-вторых, часть детергента находится в свободном состоянии в растворе, из-за чего эффективное соотношение q отличается от номинального, это отличие также зависит от концентрации [105]. В-третьих, диффузия частиц, которая используется для измерения их радиуса в случае ДРС и ЯМР также зависит от концентрации частиц по определённому закону [102]. В-четвёртых, гидродинамический радиус отличается от реального радиуса в случае частиц цилиндрической или дисковидной формы [417]. При детальном изучении, оказывается что ни одна из перечисленных работ не учитывает все указанные особенности бицелл. Таким образом, перед нами встаёт задача разработки универсальной методики для измерения радиуса частиц и концентрации свободного детергента. Методика должна быть применима в широком диапазоне температур и концентраций компонентов смеси. Для измерения радиусов частиц предлагается использовать спектроскопию ЯМР и подходы на основе импульсных градиентов магнитного поля. Соответственно, первой задачей работы будет разработка метода достоверного измерения коэффициентов диффузии.

Диффузионная спектроскопия ЯМР (DOSY) использует пространственное кодирование с помощью импульсных градиентов магнитного поля. При применении импульса градиента поперечная намагниченность (перпендикулярная направлению магнитного поля) образца получает дополнительный набег фаз, который зависит от положения молекул вещества в пространстве, вдоль направления магнитного поля (в ЯМР-спектроскопии принято обозначать направление магнитного поля осью z). Если использовать так называемое "градиентное эхо" - два градиентных импульса противоположного знака, то эффекты от двух импульсов будут компенсировать друг друга и начальная намагниченность полностью восстановится. Однако, если вследствие диффузии часть молекул изменит своё положение вдоль оси z, намагниченность восстановится не полностью. Такая "потеря" намагниченности будет зависеть от коэффициента диффузии, длительности задержки между импульсами и мощности самих импульсов. Стандартные подходы DOSY измеряют спад интенсивности сигналов в спектрах ЯМР в зависимости от мощности градиента магнитного поля при постоянной задержке на диффузию, чтобы иметь фиксированный вклад от релаксации. При измерении диффузии методами ЯМР возникают две основных проблемы - проблема конвекции и проблема подавления сигнала растворителя. Конвекция возникает из-за неравномерного нагрева образца и приводит к увеличению эффективного коэффициента диффузии из-за кольцевых потоков.

Зарегистрировать наличие конвекции можно по появлению зависимости коэффициента диффузии, измеренного методом градиентного эха, от задержки между импульсами (с увеличением задержки диффузия "ускоряется"). При этом, вероятность возникновения конвекции увеличивается с разницей между комнатной температурой и температурой измерения, из-за чего стандартные подходы могут использоваться в узком диапазоне 15-25 ºС, что неприемлемо (в лабораториях автора в помещении поддерживается постоянная температура 20 ºС). Одним из методов подавления конвекции является использование ампул, в которых существенно уменьшен внутренний диаметр за счёт увеличения толщины стенок. При этом, уменьшается объем образца (в четыре раза) и чувствительность, однако, благодаря увеличению теплопереноса и малому поперечному размеру канала ампулы вероятность возникновения конвекции существенно уменьшается. Измерения диффузии образца бицелл DMPC/DHPC q=0.5 показали, что "толстостенные ампулы" расширяют диапазон применимости метода до 5-45 ºС, правда при 40-45 ºС необходимо тщательно проверять наличие конвекции. Такой диапазон также является чрезмерно узким. Во-первых, некоторые липиды, используемые для приготовления бицелл могут иметь температуру фазового перехода 40-50 ºС (DPPC, DMPE), а во-вторых стандартные условия получения ЯМР спектров МБ в мембраноподобных средах соответствуют температуре 40-50 ºС. Наконец, можно подавить конвекцию средствами импульсных последовательностей. Для этого используют метод двойного стимулированного эха, когда эффекты от кольцевых токов будут взаимно уничтожаться, а эффект от само-диффузии останется [418]. При этом существенно уменьшается чувствительность эксперимента, а качество измерения значительно падает из-за сложностей с подавлением сигнала растворителя. Поэтому была опробована нестандартная импульсная последовательность PGSTE-watergate [419], где реализовано полное подавление сигнала растворителя и эффектов конвекции. Результат сравнения трех импульсных последовательностей - BPLED (есть подавление растворителя, нет подавления конвекции), DSTE (есть подавление конвекции, нет подавления растворителя) и PGSTE-watergate показан на рисунке 15. Видно, что использование PGSTE-watergate позволяет достигнуть полного подавления растворителя при потере 30% чувствительности. Стоит отметить, что без подавления конвекции объем образца оказывается в 4 раза меньше из-за использования толстостенных ампул, таким образом 30% потеря чувствительности на самом деле оказывается трёхкратным выигрышем. К тому же, полное подавление конвекции расширяет диапазон применимости методики до 0-100 ºС (Рис. 16). Таким образом для дальнейших измерений был выбран эксперимент PGSTE-watergate в стандартных 5 мм ампулах.

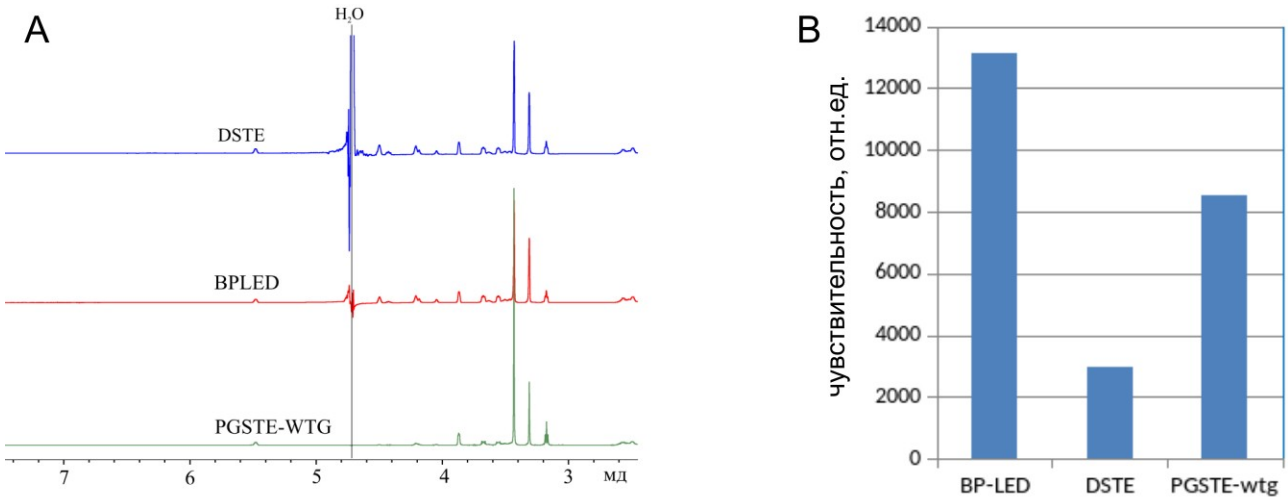

Рисунок 15. (**A**) Суперпозиция ^{1}H ЯМР-спектров бицелл DMPC/CHAPS, q*=1, полученных с помощью разных импульсных последовательнстей при 25 ºC. Показано положения пика растворителя. (**B**) Сравнение чувствительности импульсных последовательностей BPLED, DSTE и PGSTE-WTG на тестовом образце бицелл DMPC/CHAPS, q*=1.

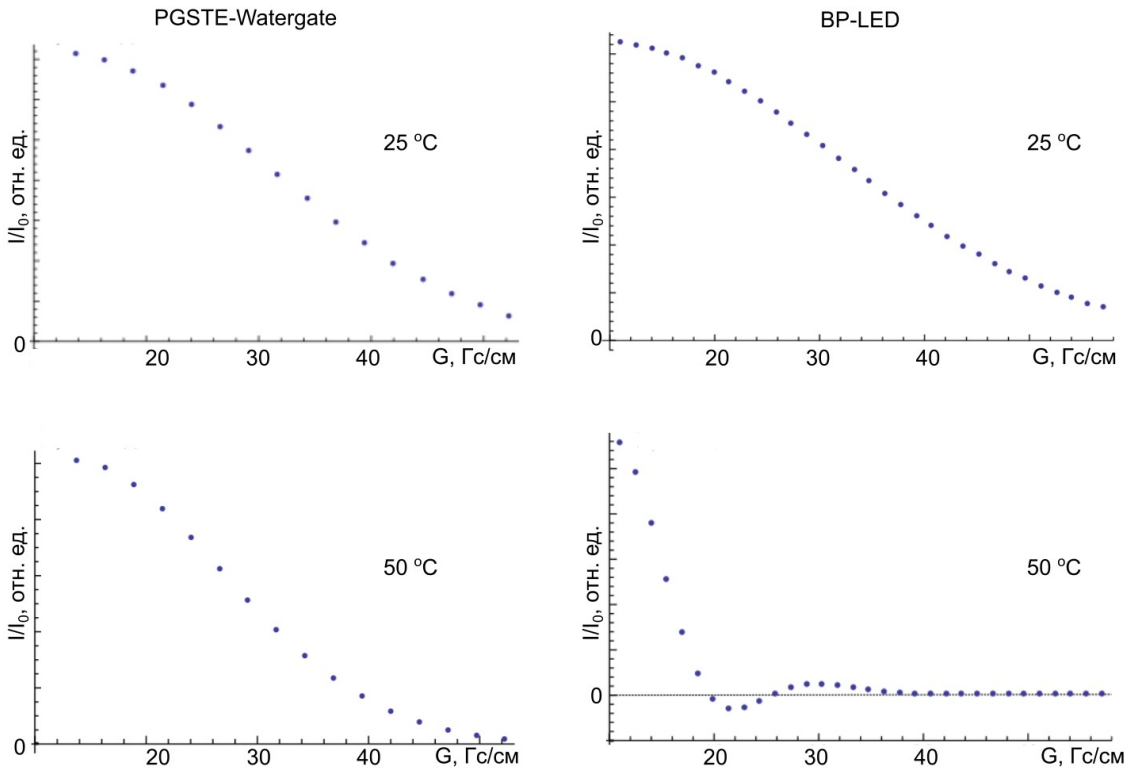

Рисунок 16. Спады интенсивности сигнала группы -N(CH_3)$_3$ в бицеллах DMPC/CHAPS q=1, полученные с использованием импульсных последовательностей BP-LED (справа) и PGSTE-Watergate (слева) при 25 (сверху) и 50 (снизу) ºC.

Коэффициент диффузии из серии ^{1}H спектров ЯМР, полученных с различной мощностью градиентов магнитного поля можно получить несколькими способами. Обычно коэффициент диффузии измеряют для ряда пиков в образце, а затем усредняют. Такой подход позволяет

уменьшить ошибку, когда в образце присутствует всего одно вещество. В случае бицелл в спектре присутствуют сигналы как от липида, так и от детергента, которые характеризуются различными коэффициентами диффузии, в силу того, что часть детергента находится в растворе в свободном виде. Это приводит к искажению результатов для некоторых сигналов из-за перекрытия, что отлично видно на рисунке 17 - для случая метильных групп.

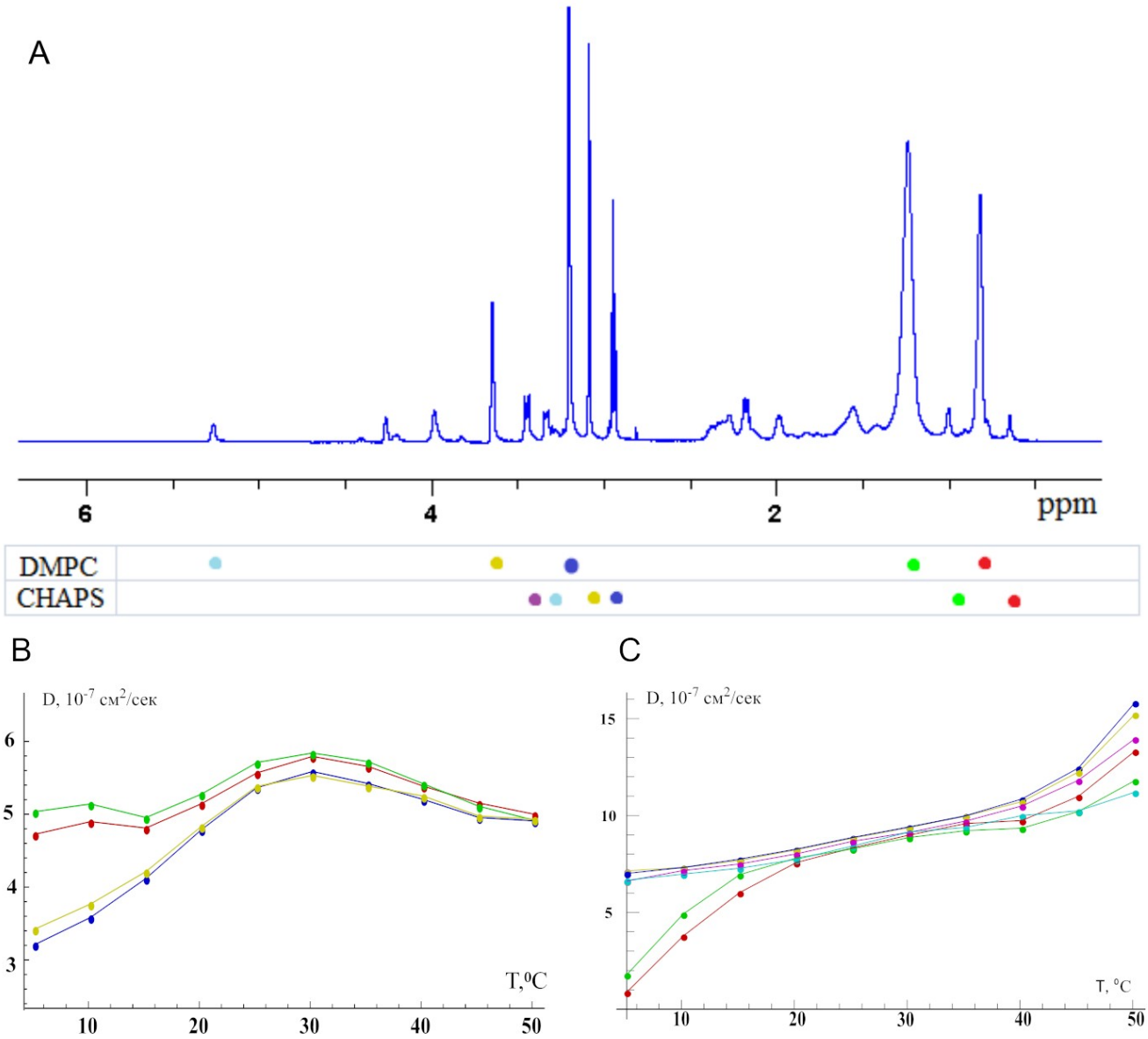

Рисунок 17. A - спектр 1H бицелл DMPC/CHAPS q=1 при 40 ºC. Сигналы липида и детергента, для которых проводилось измерение диффузии обозначены различными цветами. **B, C** - зависимость коэффициентов диффузии DMPC (**B**) и CHAPS (**C**) от температуры. Коэффициенты измерены по различным сигналам одномерного спектра, цветовое обозначение сигналов соответствует указанному на панели **A**.

При пониженных температурах, когда пики в спектрах ЯМР уширены, коэффициенты диффузии, соответствующие сигналам липида оказываются сильно завышенными из-за вклада

сигналов детергента, а коэффициенты для сигналов детергента, наоборот, - заниженными из-за вклада липида. При этом для узких пиков головных групп искажений не наблюдается. Поэтому, оптимальным подходом в случае бицелл будет анализ диффузии одного узкого отдельностоящего пика вместо усреднения нескольких сигналов. Дополнительно отметим, что узкие пики необходимо интегрировать, а не измерять амплитуду. При измерении амплитуды вклад в спад интенсивности может вносить частичная потеря гомогенности магнитного поля прибора во время эксперимента, которая приводит к уширению сигнала (Рис. 17 Б). Таким образом, для измерения коэффициентов диффузии бицелл при помощи ЯМР-спектроскопии будут интегрироваться наиболее узкие отдельно стоящие пики липидов и детергентов, такой метод позволяет достигнуть ошибки измерения, в большинстве случаев не превышающей 1-2%.

После измерения коэффициенты диффузии необходимо конвертировать в параметры бицелл - радиус и концентрацию свободного детергента. В каждом эксперименте измеряется две величины - коэффициенты диффузии липида и детергента, D_{lip} и D_{det}, которые связаны между собой следующим соотношением:

$$D_{det} = \alpha D_f + (1-\alpha) D_{lip} \quad (9),$$

где α - доля молекул детергента в свободном состоянии, а D_f - коэффициент диффузии свободного детергента, который можно измерить отдельно, использовав раствор детергента с концентрацией ниже ККМ. При этом необходимо учесть, что коэффициент диффузии детергента в присутствии бицелл будет отличаться от измеренного при низкой концентрации и применить корректировку [420]:

$$D_f = \left(D_f^0\right) / (1 + \Phi/2) \quad (10),$$

где D_f - коэффициент диффузии свободного детергента при заданной концентрации бицелл, D_f^0 - коэффициент диффузии детергента измеренный в отсутствие бицелл при концентрации ниже ККМ, а Ф - объемная доля бицелл в общем растворе. В текущей работе Ф рассчитывалась как отношение массы липидов и детергентов (за вычетом свободного детергента) к общей массе раствора, в предположении, что плотность бицелл равна плотности раствора. Таким образом, из выражений (9) и (10) можно получить концентрацию свободного детергента $[Det]_{free} = \alpha [Det]$. В свою очередь, радиус бицелл можно получить из коэффициента диффузии липидов, также скорректировав его с учётом высокой концентрации объёмных частиц [102]:

$$D_{lip} = D_{lip}^0 (1 - 3.2 \lambda \Phi) \quad (11),$$

где λ - параметр, который равен единице в случае упругих невзаимодействующих частиц. В текуще работе, для большинства расчётов принимается λ=1. D_{lip}^{0} - коэффициент диффузии липидов при бесконечном разбавлении, который зависит от гидродинамического радиуса эквивалентной сферы по закону Стокса-Эйнштейна

$$R_H = kT / 6\pi\eta D_{lip}^{0} \quad (12).$$

Здесь k - постоянная Больцмана, T - температура в K, а η - динамическая вязкость раствора. Наконец, чтобы учесть форму бицелл необходимо использовать форм-фактор в предположении, что бицеллы представляют собой цилиндры с радиусом R и высотой h [417]:

$$f / f_0 = 1.009 + 1.395 \times 10^{-2} \ln p + 7.880 \times 10^{-2} \ln p^2 + 6.040 \times 10^{-3} \ln p^3 \quad (13),$$

где p - отношение размеров цилиндра $h/2R$, $f = kT / D_{lip}^{0}$ и $f_0 = 6\pi\eta h \left(3/16\, p^2\right)^{1/3}$. Уравнение (13) можно решить численно при известной толщине бислоя h. В литературе можно встретить несколько параметров, характеризующих толщину бислоев [413]. Так, например, D_C описывает толщину гидрофобного участка (расстояние между карбоксильными группами ацильных цепей, 2.62 нм для DMPC). Параметр D_H описывает среднее расстояние между головными группами и равняется 3.6 нм для DMPC, а стерическая толщина $D_{B'}$ равняется толщине гидрофодного участка с добавлением толщины головных групп D_{HH}, которая принимается равной 0.9 нм для фосфатидилхолина и 0.85 нм для фосфатидилэтаноламина. В случае DMPC $D_{B'}$ равняется 4.4 нм и именно эта величина используется в данной работе в качестве параметра h при расчёте радиусов бицелл. Толщина бицелл, сформированных другими фосфолипидами также принималась равной $D_{B'}$, в соответствии с литературными данными.

В совокупности, уравнения (9)-(13) представляют собой полный набор преобразований, необходимый для получения параметров бицелл из коэффициентов диффузии и должны позволять проводить воспроизводимые измерения радиусов частиц, результаты которых согласуются с другими методами. Для апробации предложенной методики были измерены размеры ЛБН на основе MSP1D1 и MSP1ΔH5. В отличие от малых бицелл, дисковидная форма ЛБН была показана напрямую при помощи электронной микроскопии [42], а присутствие липидного бислоя продемонстрировано при наблюдении фазовых переходов [116]. Измеренный на основе коэффициентов диффузии радиус ЛБН MSP1D1/DMPC составил 4.9±0.1 нм и не менялся в диапазоне температур 27-40 ºC. Полученная величина согласуется с результатами других исследований: ранее были опубликованы значения 5.1-5.2 нм (малоугловое рассеяние рентгеновских лучей [116]), 4.7 нм (малоугловое рассеяние нейтронов [117]), 4.75 нм (крио-ЭМ

[42]) и 4.7 нм (ДСР без учета форм-фактора [42]). Для ЛБН MSP1ΔH5/DMPC радиус составил 4.1±0.1 нм, что также совпало с литературными данными (4.1 нм по данным крио-ЭМ и 4.2 нм по данным ДСР [42]). Таким образом, можно констатировать, что разработанная методика позволяет получать воспроизводимые результаты для дисковидных частиц при различных температурах, получаемые данные согласуются с независимыми измерениями при помощи других физических методов.

На следующем этапе были изучены бицеллы DMPC/DHPC q=0.5, так как для этих частиц можно найти большое количество литературных данных. Использование уравнений (9)-(13) позволило получить следующие параметры: D_o=111±1x10^{-12} $м^2с^{-1}$, R=3.1±0.1 нм, $[Det]_{free}$= 8.3±0.3 мМ при q'=0.53 и 40 °C. Согласно данным ДРС, радиус бицелл с q=0.5 лежит в диапазоне 2.9-3.3 нм, в зависимости от общей концентрации частиц, что согласуется с указанными значениями [86]. Измерения при помощи ^{31}P ЯМР приводят значение 7-8 мМ для $[Det]_{free}$, при данном соотношении q' [105]. С другой стороны, исследования методами ЯМР приводят радиус 4.1 нм при 25 ºC [103] и 6-8 нм при различных температурах [421]. Внимательный анализ показывает, что в первой работе [103] не применялась поправка на концентрацию бицелл (11), а также на наличие детергента в свободной форме (эффективное соотношение q' могло оказаться существенно выше номинального q), а во втором случае проводилась серия экспериментов по разбавлению бицелл буферным раствором, не содержащим детергент. Такое разбавление приводит к постоянному изменению q и увеличению размера бицелл, что в результате даёт неправильное значение коэффициентов λ и D_{lip}^0 в уравнении (11). Действительно, если взять коэффициент диффузии D=56x10^{-12} $м^2с^{-1}$ при 25 ºC и 200 мМ суммарных липидов, который упоминается в работе [421], то применение уравнения (11) с параметром λ=1 даёт радиус 2.96 нм, что отлично согласуется с данными ДРС и результатами настоящей работы.

Наконец, для окончательной проверки методики была проведена серия экспериментов по измерению радиусов бицелл DMPC/DHPC с различными значениями q в диапазоне от 0.31 (2.5 нм) до 0.82 (4.3 нм). Измерения проводились при двух значениях температуры, 27 и 40 ºC для контроля за наличием влияния температуры на свойства бицелл. Зависимости R(q) следуют модели идеальной бицеллы (7) с толщиной обода 1.15 нм и соотношением объёмов детергента и липида равным 0.6 (Рис. 18А). Стоит отметить, что размер бицелл зависит от температуры. При q<0.6 бицеллы на 0.1-0.2 нм больше при 27 ºC, чем при 40 ºC, в то время как для q=0.82 бицеллы оказываются, наоборот, на 0.3 нм больше при высокой температуре. Природа температурной зависимости размеров бицелл будет обсуждена позднее.

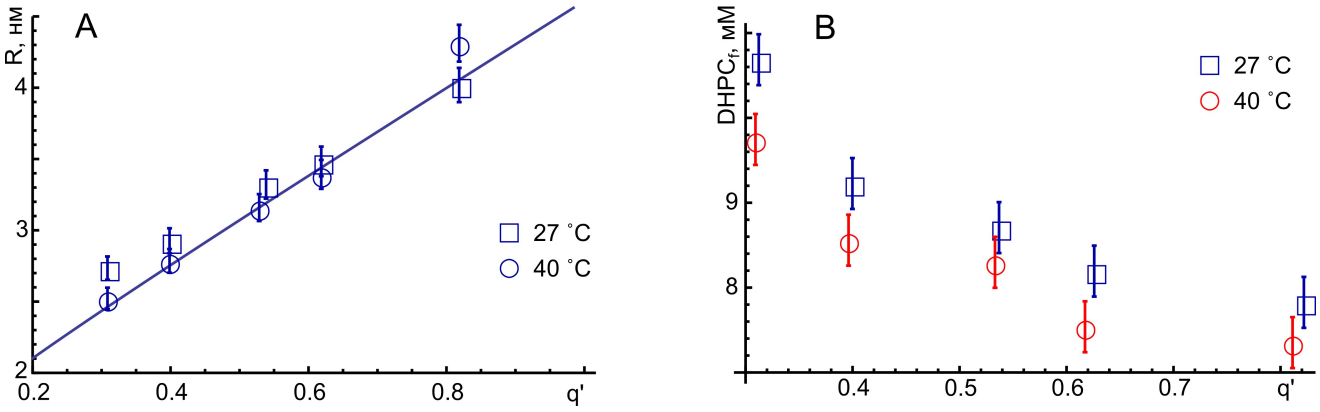

Рисунок 18. **A** - зависимость R(q') бицелл DMPC/DHPC при 27 (квадраты) и 40 ºC (круги). Линией показана теоретическая зависимость в соответствии с моделью идеальной бицеллы (уравнение (7)). **B** - концентрация мономерного DHPC в растворах бицелл DMPC/DHPC.

Как показали проведённые измерения, концентрация DHPC в растворе также зависит и от температуры, и от соотношения q (Рис. 18B). Зависимость от q выражена более ярко - $[Det]_{free}$ постепенно снижается с 9.7 мМ при q'=0.31 до 7.3 мМ при q'=0.82 при 40 ºC. Измеренные нами значения $[Det]_{free}$ при обоих температурах оказываются выше, чем полученные из химических сдвигов ^{31}P [105], что легко объяснимо. Ранее измерения проводили посредством разбавления водой раствора бицелл, концентрацию детергента в растворе считали постоянной, что позволяло аппроксимировать зависимость химического сдвига фосфатной группы DHPC от концентрации. Однако же, эта модель неверна, поскольку, как видно, при разбавлении увеличивается соотношение q', что, в свою очередь приводит к уменьшению $[Det]_{free}$. Иными словами, можно утверждать, что концентрация мономерного детергента, измеренная в данной работе, является более точной и должна соответствовать действительности. Параметры бицелл DMPC/DHPC приведены в таблице 2. Предложенная в рамках работы методика позволяет напрямую измерять как размер бицелл, так и $[Det]_{free}$. Как будет показано позднее, $[Det]_{free}$ является чрезвычайно важным параметром бицелл, поскольку он позволяет контролировать их размер при низких концентрациях липидов.

Таблица 2. Параметры растворов бицелл DMPC/DHPC (коэффициент диффузии при бесконечном разбавлении, радиус и концентрация свободного детергента)

q' *(40°C)*	*D_0, x10^{-12} м^{2}с$^{-1}$ (27°C)*	*D_0, x10^{-12} м^{2}с$^{-1}$ (40°C)*	*R, нм (27°C)*	*R, нм (40°C)*	*$[Det]_{free}$, мМ (27°C)*	*$[Det]_{free}$, мМ (40°C)*	*[DMPC]+ [DHPC], мМ*
0.31[a]	91[b]	130	2.69	2.48	10.7[c]	9.7	134
0.40	87	122	2.88	2.74	9.2	8.6	112
0.54	79	111	3.27	3.11	8.7	8.3	97
0.63	77	106	3.43	3.34	8.2	7.5	85
0.82	69	87	3.96	4.25	7.8	7.4	74

[a] эффеткивные соотношения q' слегка зависят от температуры из-за разницы в концентрации свободного детергента
[b]ошибка измерения коэффициентов диффузии и радиуса частиц находится в пределах 1%.
[c]Ошибка измерения $[Det]_{free}$ меняется от образца к образцу, но не превышает 5%

4.3. Параметры бицелл на основе CHAPS.

Разработанная методика была в первую очередь использована для исследования размеров бицелл на основе плоских амфифилов. Плоские амфифилы являются гораздо более мягкими детергентами, чем DHPC, и гораздо более деликатны в отношении мембранных и растворимых белков, что может быть важным фактором при исследовании крупных фрагментов МБ, содержащих водорастворимые домены. Так, например, добавление 0.1 % DHPC (2 мМ) понижает флуоресценцию GFP на два порядка при бесклеточной экспрессии, в то время как в присутствии 4-15 мМ бицелл DMPC/CHAPS q=1 флуоресценция сохранялась (хотя, очевидно, эффективное соотношение q было другим) [422]. Тем не менее, до начала данной работы в литературе напрочь отсутствовала информация о размерах и структуре бицелл на основе CHAPS или его аналога CHAPSO, который обычно применяется для приготовления анизотропных бицелл [78]. Поэтому, были проведены измерения параметров бицелл DMPC/CHAPS и DMPC/CHAPSO, результаты измерения показаны в таблице 3. (Рис. 19А) Наблюдаются некоторые отличия данных бицелл от частиц DMPC/DHPC. В первую очередь, оба детергента формируют бицеллы, которые значительно меньше, чем частицы, образованные с участием DHPC при равных соотношениях q. Например, бицеллы DMPC/CHAPS имеют радиус 3.2-3.4 нм при q=0.9-1.0, что соответствует смесям DMPC/DHPC с q=0.5-0.6. В соответствии с моделью идеальной бицеллы (8), зависимость R(q) должна быть линейной или почти линейной. Анализ полученных кривых показал, что размер бицелл DMPC/CHAPS согласуется с моделью (8) при 27 и 40 ºC только в при q<1.1. Параметры модели идеальной бицеллы оказываются следующими: $r = 1.20 \pm 0.06$ нм, $\lambda = 1.73 \pm 0.2$.

Таблица 3. Параметры растворов бицелл DMPC/CHAPS (коэффициент диффузии при бесконечном разбавлении, радиус и концентрация свободного детергента)

*q** *(40°C)*	D_0, $x10^{-12}$ $м^2с^{-1}$ *(27°C)*	D_0, $x10^{-12}$ $м^2с^{-1}$ *(40°C)*	*R, нм (27°C)*	*R, нм (40°C)*	$[Det]_{free}$, *мМ (27°C)*	$[Det]_{free}$, *мМ (40°C)*	*[DMPC]+ [CHAPS], мМ*
0.40	100	139	2.36	2.27	6.2	7.6	102
0.54	98	132	2.44	2.46	5.7	6.7	73
0.66	95	126	2.54	2.60	4.8	5.8	66
0.87	86	117	2.92	2.91	3.9	4.3	57
1.01	82	108	3.14	3.27	3.2	3.7	56
1.09	79	103	3.31	3.48	3.0	3.2	50
1.16	72	97	3.70	3.89	3.0	2.8	49
1.29	68	83	3.99	4.61	2.8	2.7	56
1.40	62	69	4.53	5.87	2.6	2.8	54
1.54	54	53	5.41	8.10	2.3	2.6	47

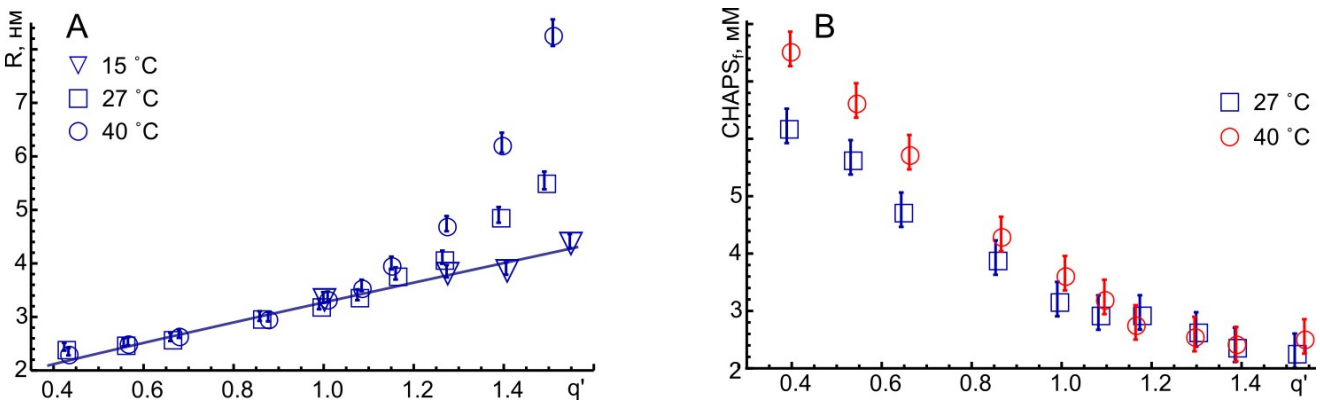

Рисунок 19. А - зависимость R(q') бицелл DMPC/CHAPS при 15 (треугольники), 27 (квадраты) и 40 ºC (круги). Линией показана теоретическая зависимость в соответствии с моделью идеальной бицеллы (уравнение (8)). **В** - концентрация мономерного CHAPS в растворах бицелл DMPC/CHAPS.

При q>1.1 бицеллы становятся больше, чем ожидается при указанных параметрах модели (8), размер бицелл начинает зависеть от температуры. При этом, при температуре ниже температуры фазового перехода DMPC, даже большие бицеллы с q>1.1 соответствуют модели идеальной бицеллы. Предлагается назвать данное явление "температурно-зависимым ростом" бицелл среднего размера (ТЗР). Действительно, размер бицелл с q=1.05 не меняется в диапазоне температур 10-50 ºC (Рис. 20В), при больших q бицеллы начинают расти при нагреве, при этом эффект тем ярче выражен, чем больше соотношение q. При q=1.55 частицы увеличиваются с 4.2 нм при 15 ºC до 9.5 нм при 50 ºC. Похожий эффект, выраженный в меньшей степени, можно наблюдать и для бицелл DMPC/DHPC (Рис. 20А), что было описано в литературе [423]. Отметим, что феномен ТЗР нельзя объяснить фазовым переходом между жидко-кристаллическим (ж.к.) и гелевым состояниями липидов бицелл. При фазовом переходе в

бислое средняя площадь на одну головку липидов увеличивается на 10-20%, что должно привести к пропорциональному увеличению размера бицелл, согласно модели (9), не превышающему те же 20% [413]. Таким образом, можно заключить, что при температурах ниже точки фазового перехода DMPC бицеллы DMPC/CHAPS соответствуют идеальной модели, в то время как при высоких температурах бицеллы большого размера ведут себя неидеально, что вероятнее всего связано с изменением структуры/морфологии бицелл и подтверждается рядом работ, в которых для бицелл с q=2-3 при определённых концентрациях липидов и температурах наблюдаются цилиндрические и ленточные структуры [83].

Концентрация детергента в растворе в случае CHAPS меньше, чем у DHPC, также наблюдается зависимость концентрации от q и от температуры. Так, при q=0.4 концентрация CHAPS в растворе составила 6.3 мМ, и постепенно уменьшалась до 2.3 мМ при q=1.5 (Рис. 19B). Зависимость от температуры менее выражена. В растворе бицелл с q=1.55 $[Det]_{free}$ сначала падает с 4 до 2.3 мМ в при нагреве от 10 до 25 ºC, а затем медленно растет до 2.8 мМ при 50 ºC (Рис. 20D).

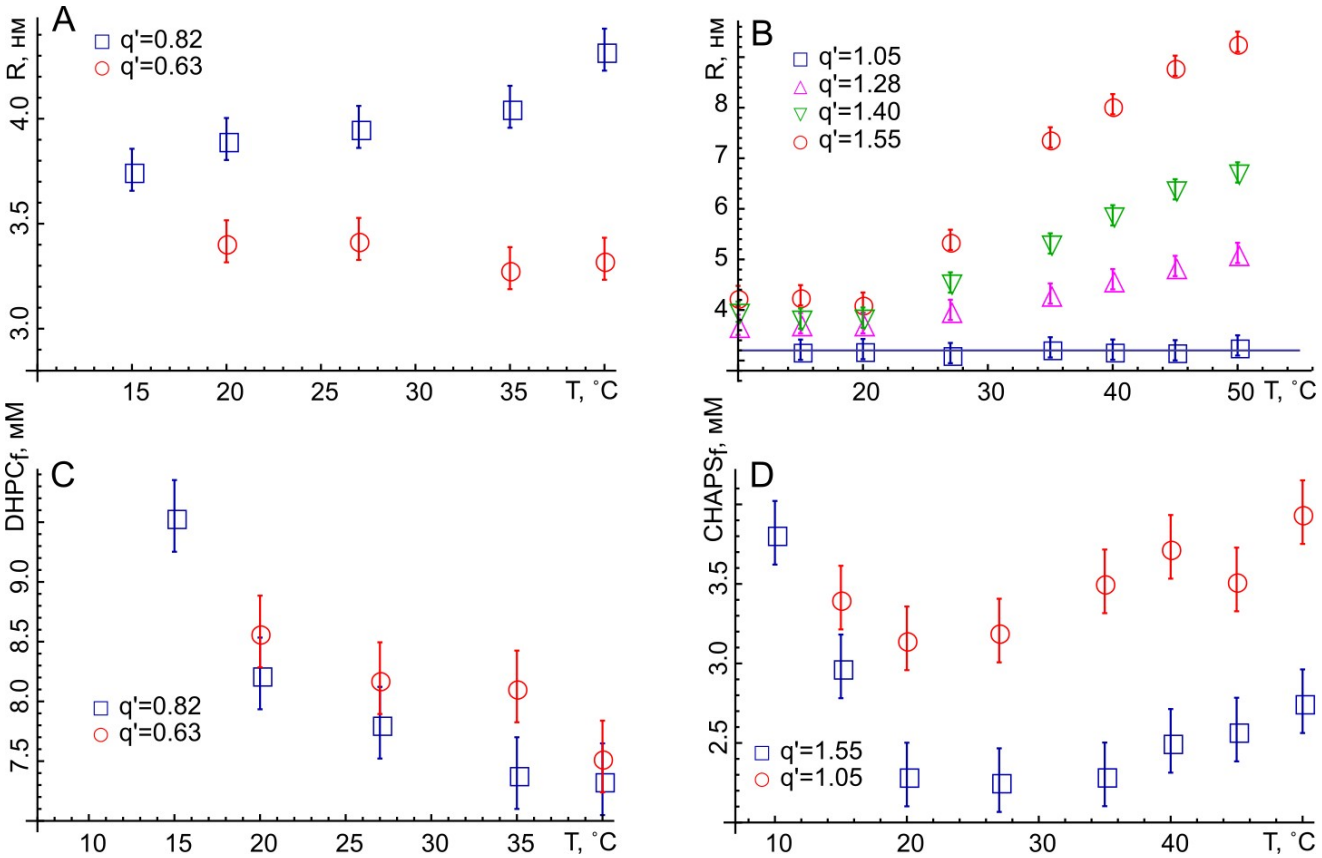

Рисунок 20. A, B - Зависимость размера бицелл от температуры в смесях DMPC/DHPC (**A**) и DMPC/CHAPS (**B**), q' исследованных растворов указан в легенде. **C,D -** зависимость концентрации детергента в растворе от температуры, измеренная для смесей DMPC/DHPC (**C**) и DMPC/CHAPS (**D**).

4.4. Параметры бицелл на основе CHAPSO и холиевой кислоты.

Большинство работ в области анизотропных бицелл опирается на использование CHAPSO в качестве ободообразующего детергента [83]. При этом, отличия CHAPSO от CHAPS незначительны и ограничиваются одной гидроксильной группой в полярном "хвосте" детергента. Как оказалось, малые изотропные бицеллы на основе CHAPSO практически идентичны бицеллам на основе CHAPS (Рис. 21). Зависимость R(q) близки, бицеллы с q>1.1 также увеличиваются при нагреве, концентрации детергента в растворе не различались. Бицеллы DMPC/CHAPSO с q~1 оказываются на 5-7% больше, чем бицеллы DMPC/CHAPS, однако, такое расхождение может считаться незначительным. Автору не удалось найти в литературе причину, по которой CHAPSO предпочитают CHAPS при приготовлении анизотропных бицелл, однако, очевидно, что с точки зрения применения для нужд ЯМР высокого разрешения в малых изотропных бицеллах эти два детергента эквивалентны. С учётом того, что стоимость CHAPS в 4 раза ниже, предлагается в дальнейшем рассматривать бицеллы только на основе данного детергента. Характеристики смесей DMPC/CHAPSO приведены в таблице 4.

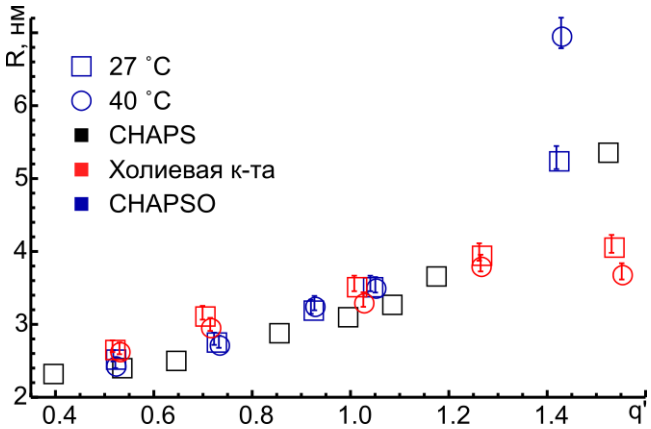

Рисунок 21. Зависимости радиуса бицелл DMPC/CHAPSO (синим) и DMPC/Холат (красным) от соотношения q', измеренные при температурах 27 (показано квадратами) и 40 (показано кругами) ºC. Для сравнения черными квадратами показана зависимость для DMPC/CHAPS при 27 ºC.

Таблица 4. Параметры растворов бицелл DMPC/CHAPSO (коэффициент диффузии при бесконечном разбавлении, радиус и концентрация свободного детергента)

*q** *(40°C)*	D_0, $x10^{-12}$ $м^2с^{-1}$ *(27°C)*	D_0, $x10^{-12}$ $м^2с^{-1}$ *(40°C)*	*R, нм (27°C)*	*R, нм (40°C)*	$[Det]_{free}$, *мМ (27°C)*	$[Det]_{free}$, *мМ (40°C)*	*[DMPC]+ [CHAPSO], мМ*
0.52	94	131	2.56	2.46	5.6	6.0	86
0.72	89	121	2.79	2.75	4.1	4.6	67
0.92	80	107	3.23	3.28	3.1	3.5	105
1.04	75	102	3.55	3.53	2.8	3.1	66
1.42	55	60	5.28	6.99	2.5	2.6	61

Другим часто применяемым плоским амфифилом является холиевая кислота. Этот детергент чрезвычайно дешёв и именно он использовался в первых работах, связанных с бицеллами, как классом мембраноподобных сред [4], поэтому были изучены малые изотропные бицеллы, сформированные с участием холиевой кислоты. Как оказалось, бицеллы DMPC/Холат не согласуются с идеальной моделью (Таблица 5). При малых q радиус бицелл оказывается на 20% больше, чем в случае CHAPS, начиная с q=1, размер бицелл практически перестаёт увеличиваться с повышением содержания липидов, эффект ТЗР не наблюдается. Особое поведение бицелл на основе холиевой кислоты отражается и во внешнем виде спектров ЯМР. Очевидно, что параметры упаковки ацильных цепей влияют на свойства пиков метильных групп липидов в спектрах ^{1}H. Отметим, что форма пика метильных групп одинакова для всех типов бицелл, кроме DMPC/Холат - две цепи липидов оказываются неэквивалентными, в результате в спектре видны два триплета, с расстоянием между ними менее 0.01 м.д. Сигналы метильных групп симметричны, соотношения между двумя сигналами 1:1 (Рисунок 22). При этом, расстояние между сигналами метильных групп растёт вместе с размером бицелл, для самых малых частиц на основе CHAPS это расстояние уменьшается до нуля и виден только один триплет. Более того, положение сигнала метильной группы не зависит от размера бицелл, а расстояние между двумя триплетами одинаково для бицелл DMPC/DHPC и DMPC/CHAPS одного размера. Совершенно иная картина наблюдается для бицелл на основе холиевой кислоты. В случае малого размера бицелл пик от метильной группы оказывается значительно уширен, для бицелл с q>1 появляются два сигнала метильных групп, которые, при этом имеют различную интенсивность. Вместе, описанные явления указывают на наличие смешивания между липидом и детергентом.

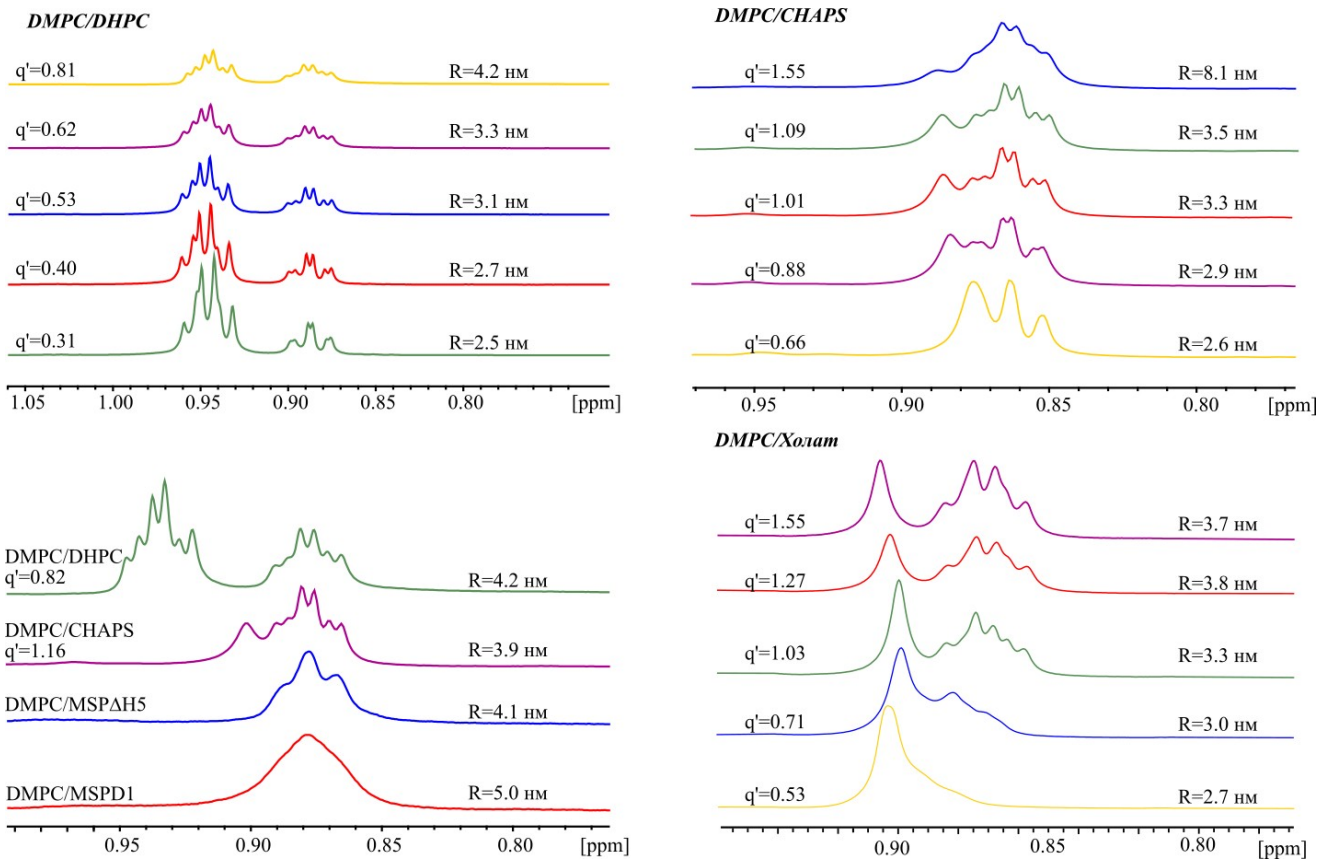

Рисунок 22. Фрагменты спектров ЯМР 1H бицелл DMPC/DHPC, DMPC/CHAPS, DMPC/Холат, а также ЛБН DMPC/MSP1D1 и DMPC/MSP1D1ΔH5. Фрагменты содержат сигналы от метильных групп липидов и детергентов. Спектры получены при различных соотношениях q и температуре 40 ºC, радиус бицелл указан рядом с соответствующими спектрами.

При этом, если детергент попадает в плоскую часть бицеллы, то размер частицы должен увеличиться по сравнению с идеальной бицеллой, поскольку миграция детергента в бислой эквивалентно увеличению соотношения q'. В случае бицелл на основе холиевой кислоты, при q>1 они оказываются меньше, чем бицеллы на основе CHAPS (Рис. 21), что указывает на миграцию липида в область обода бицеллы (если дисковидная форма частиц сохраняется). Отдельно стоит отметить форму сигналов от метильных групп липидов в случае ЛБН. На рисунке 22 приведены спектры бицелл и ЛБН MSP1D1ΔH5 размером 3.9-4.2 нм. Видно, что в случае ЛБН не наблюдается двух отдельных триплетов метильных групп, которые оказываются эквивалентны. Также видно, что сигнал существенно уширен по сравнению с бицеллами сопоставимого размера, что свидетельствует о различной подвижности ацильных цепей липидов в бицеллах и ЛБН. Не совсем очевидно, как можно интерпретировать данное наблюдение, поскольку состояние липидов в нанодисках существенно отличается от состояния липидов в липосомах, в нанодисках липиды упакованы плотнее и менее подвижны, согласно

данным ЭПР-спектроскопии [117,123,124]. Возможно, бицеллы предоставляют более нативное окружение МБ, чем ЛБН в силу увеличенной подвижности ацильных цепей липидов, а ЛБН можно использовать для имитации упорядоченной фазы. С другой стороны, липиды в ЛБН претерпевают фазовый переход, при температурах, близких к критической температуре липидного бислоя [116], что говорит в пользу того, что в нанодисках липиды находятся все же в ж.-к. состоянии.

Таблица 5. Параметры растворов бицелл DMPC/Холиевая кислота (коэффициент диффузии при бесконечном разбавлении, радиус и концентрация свободного детергента)

*q** *(40°C)*	D_0, $x10^{-12}$ $м^2с^{-1}$ *(27°C)*	D_0, $x10^{-12}$ $м^2с^{-1}$ *(40°C)*	*R, нм (27°C)*	*R, нм (40°C)*	$[Det]_{free}$, *мМ (27°C)*	$[Det]_{free}$, *мМ (40°C)*	*[DMPC]+ [Холат], мМ*
0.53	91	124	2.69	2.66	10.4	11.3	90
0.71	81	115	3.15	2.99	10.0	10.9	85
1.03	75	106	3.55	3.33	9.1	9.6	63
1.27	69	96	3.98	3.83	8.3	8.3	61
1.55	67	98	4.10	3.72	7.9	8.1	56

4.5. Параметры бицелл на основе детергентов Façade.

Использование изотропных бицелл сопряжено с рядом проблем при изучении структуры МБ. Во-первых, даже такой мягкий детергент, как CHAPS, все равно может негативно влиять на активность белков, как мембранных, так и растворимых. Это отчётливо видно в работах по бесклеточной продукции - добавление CHAPS в концентрациях выше ККМ, и даже бицелл DMPC/CHAPS в концентрации свыше 15 мМ значительно ингибирует синтез белков. Во-вторых, обнаруженный в рамках настоящей работы эффект ТЗР препятствует применению изотропных бицелл среднего размера (3.5-4.5 нм). Однако, если белок содержит примембранные регионы, может понадобиться использовать бицеллы, которые содержат достаточно большой участок бислоя, что невозможно, поскольку ТЗР скорее всего связан с изменением структуры частиц. В-третьих, и DHPC, и CHAPS характеризуются сравнительно высоким ККМ и присутствуют в растворе в высокой концентрации. Это мешает контролировать размер бицелл при низких концентрациях, когда номинальное соотношение q значительно отличается от эффективного. Поэтому, предлагается разработать новые обод-формирующие агенты для бицелл, обладающие следующими свойствами:

1. Низкая ККМ.
2. Сверх-мягкие свойства.
3. Низкая смешиваемость с липидами.

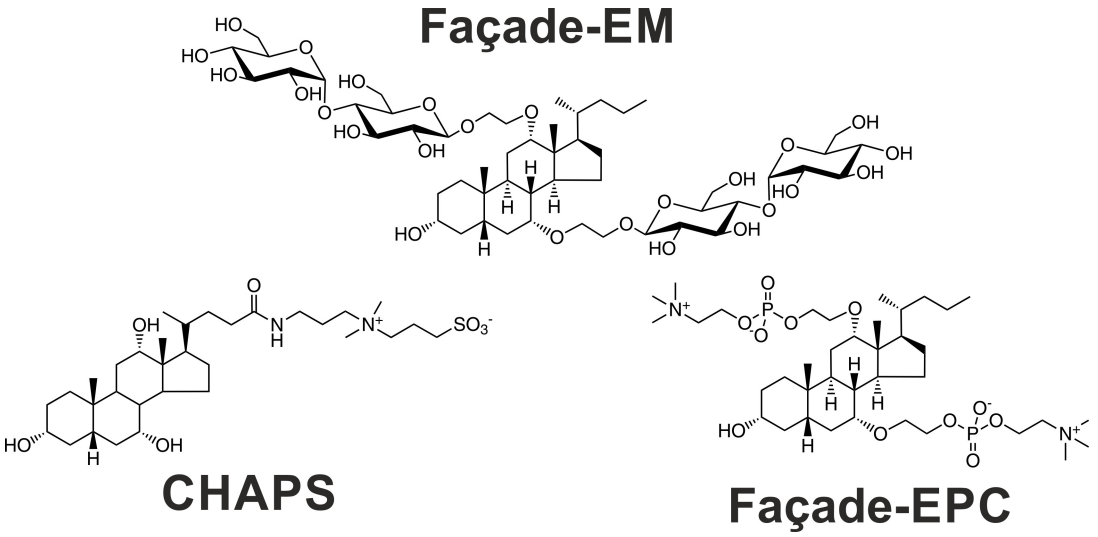

Рисунок 23. Сравнение структуры CHAPS и структур двух детергентов Façade.

Как оказалось, походящие детергенты были предложены сравнительно недавно для кристаллизации мембранных белков и получили название общее название Façade [424]. Детергенты Façade также являются производными холиевой кислоты, как CHAPS и CHAPSO. Однако, вместо модификации полярного "хвоста" холата, авторы предложили модифицировать плоскую полярную поверхность, содержащую три гидроксильные группы, с целью сделать молекулы детергентов более амфифильными и понизить ККМ (Рис. 23). При этом, модификация проводилась либо с использованием углеводов (глюкозы и мальтозы), либо фосфохолина. Всего авторы предложили 7 различных вариантов. Одним из последствий такой модификации, помимо понижения ККМ вплоть до 0.1 мМ оказалась пониженная смешиваемость липидов и детергентов. В оригинальной статье упоминается, что два детергента - Façade-EM и Façade-EPC способны растворять липидные везикулы даже при соотношениях липид детергент 10:1 [424]. Данный факт позволяет предположить, что детергенты Façade могут быть превосходными ободообразующими агентами как для малых изотропных, так и для анизотропных бицелл, при этом в таком качестве детергенты ещё никогда не использовались. Дополнительно, Façade-EPC был выбран, поскольку имеет наименьший молекулярный вес (797 Да), и, следовательно, в предположении, что обод формируется одинаково, бицеллы на основе данного детергента должны содержать больше липидов при том же размере. Façade-EM - один из четырёх детергентов, модифицированных остатками углеводов и содержит два остатка мальтозы. Он имеет б**о**льшую массу (1115 Да), чем Façade-TEG (996 Да, три остатка глюкозы). Однако, молекула Façade-EM имеет объёмные полярные цепи, её амфифильность более выражена, следовательно, можно ожидать, что такой детергент будет с меньшей вероятностью проникать в бислойную область бицеллы.

Для проверки гипотезы о способности детергентов Façade формировать бицеллы была приготовлена серия растворов DMPC/Façade-EM и DMPC/Façade-EPC с различным соотношением q и была изучена зависимость размера бицелл от q и температуры (при 15, 27 и 50 ºC - ниже, выше и вблизи температуры фазового перехода бислоя DMPC). Сравнение проводилось с бицеллами на основе CHAPS, поскольку CHAPS также является плоским амфифилом. Анализ данных, полученных для частиц DMPC/Façade-EM, показывает, что Façade-EM, как ободообразующий агент, ведёт себя схожим образом с CHAPS. Сигналы липидов в метильной области спектра ^{1}H имеют характерную форму (два разрешённых триплета одинаковой интенсивности), что свидетельствует об однородности окружения ацильных цепей (Рис. 24C). Бицеллы на основе Façade-EM при q<1 оказываются больше, чем бицеллы CHAPS, при q=0.6 отличие составляет 0.4 нм, что можно объяснить большей толщиной обода из объёмных молекул Façade-EM. Однако, зависимость R(q) в случае Façade-EM является более пологой и при q>1.3-1.4 частицы на основе гликозилированного детергента уже меньше частиц DMPC/CHAPS (Рис. 24A). Аппроксимация данных, полученных при 15 ºC, уравнением (8) позволяет получить следующие параметры: r=1.7±0.1 нм, λ=3.1±0.4. Таким образом, обод из Façade-EM оказывается на 0.5 нм толще, чем обод из CHAPS, при этом средний объем молекулы детергента возрастает на 79%, в предположении, что объем липида в бицеллах двух типов одинаков. Параметр λ согласуется со структурой молекул и их молекулярным весом, который в случае Façade-EM на 81% больше, что можно рассматривать как одно из подтверждений предложенной в работе модели идеальной бицеллы для плоских амфифилов (уравнение (8)).

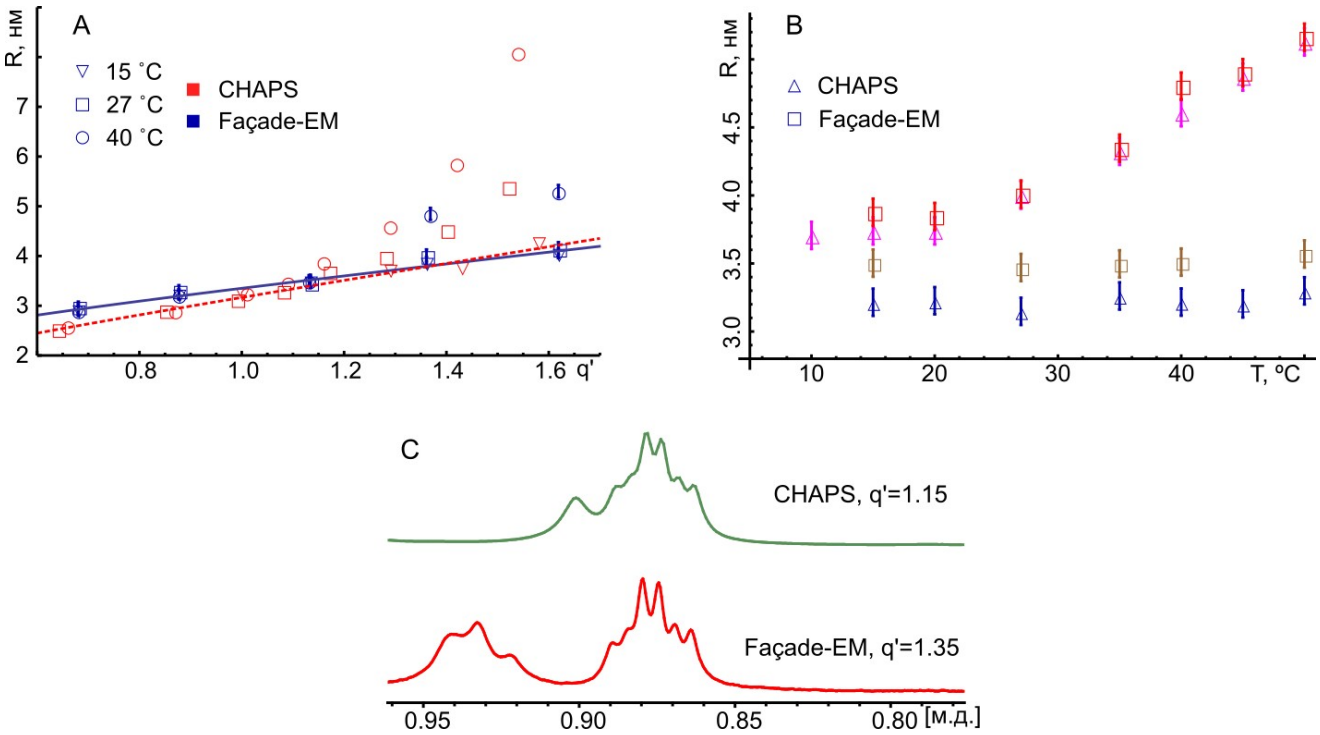

Рисунок 24. A - зависимости R(q') бицелл DMPC/Façade-EM(показаны синим) при 15 (треугольники), 27 (квадраты) и 40 (круги) ºC. Для сравнения, красным приведены схожие данные для бицелл DMPC/CHAPS . Синяя и красная линия соответствует моделям идеальной бицеллы при 15 ºC (8), с параметрами, указанными в тексте работы, для Façade-EM и CHAPS, соответственно. **B** - зависимость R(T) бицелл DMPC/CHAPS q'=1.0 (зелёные треугольники) и q'=1.28 (розовые треугольники), а также бицелл DMPC/Façade-EM q=1.15 (коричневые квадраты) и q=1.36 (красные квадраты). В случае Façade-EM концентрация детергента в растворе была настолько мала, что ее не удалось достоверно измерить и принималось, что q=q'. **C** - регионы метильных групп спектров 1H ЯМР бицелл DMPC/CHAPS q'=1.15 (показан зеленым), и DMPC/Façade-EM q=1.35. Спектры получены при 40 ºC, регионы содержат сигналы от метильных групп ацильных цепей липидов в 0.87 м.д.

Как и другие бицеллы, частицы DMPC/Façade-EM подвержены эффекту ТЗР, который оказывается несколько ослабленным (Рис. 24 B). Стоит отметить, что бицеллы на основе Façade-EM начинают расти при более высоких температурах. Так, на рисунке 24A можно увидеть, что размеры частиц DMPC/Façade-EM одинаковы при 15 и 27 ºC, в то время, как для смесей DMPC/CHAPS размер бицелл при этих температурах разнится, в случае высоких q разница может достигать 1.5 нм. Наконец, эффект менее выражен: в то время, как размер бицелл DMPC/CHAPS q=1.5 увеличивается в два раза при нагреве с 15 до 40 ºC, радиус бицелл DMPC/ Façade-EM q=1.6 прибавляет всего лишь 20%. Резюмируя данную часть, можно заключить, что использование Façade-EM вместо CHAPS, позволяет получить бицеллы с более толстым ободом, и, следовательно, меньшим участком липидного бислоя, однако, размер таких бицелл в меньшей степени подвержен влиянию высоких температур.

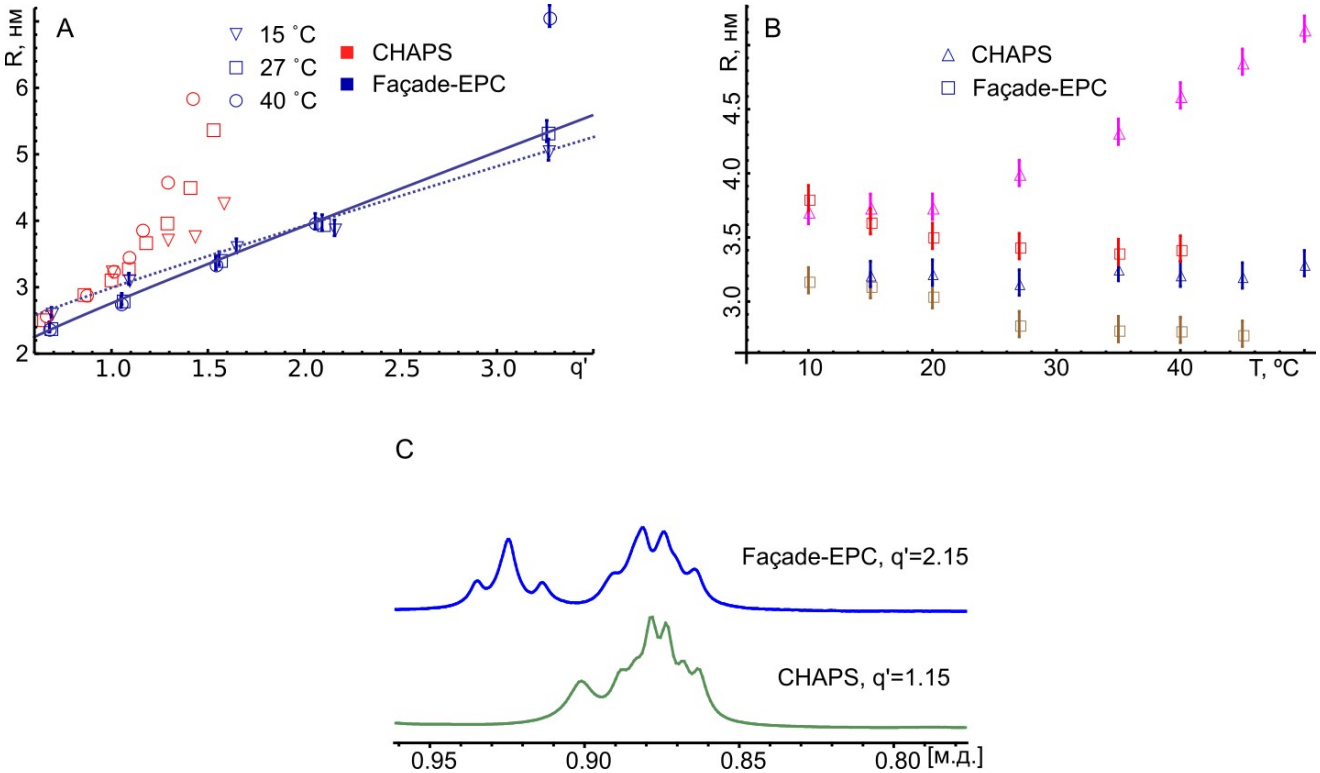

Рисунок 25. A - зависимости R(q') бицелл DMPC/Façade-EPC (показаны синим) при 15 (треугольники), 27 (квадраты) и 40 (круги) ºC. Для сравнения, красным приведены схожие данные для бицелл DMPC/CHAPS . Синие линии соответствует моделям идеальной бицеллы при 15 (пунктир) и 27 ºC (8), с параметрами, указанными в тексте работы. **B** - зависимость R(T) бицелл DMPC/CHAPS q'=1.0 (зеленые треугольники) и q'=1.28 (розовые треугольники), а также бицелл DMPC/Façade-EPC q=1.1 (коричневые квадраты) и q=1.6 (красные квадраты). В случае Façade-EM концентрация детергента в растворе была настолько мала, что ее не удалось достоверно измерить и принмалось, что q=q'. **C** - регионы метильных групп спектров 1H ЯМР бицелл DMPC/CHAPS q'=1.15 (показан зеленым), и DMPC/Façade-EPC q=2.15. Спектры получены при 40 ºC, регионы содержат сигналы от метильных групп айильных цепей липидов в 0.87 м.д.

Немного другая картина наблюдается при использовании детергента Façade-EPC, поведение таких бицелл существенно отличается от бицелл на основе CHAPS. Во-первых, бицеллы из Façade-EPC оказываются существенно меньше бицелл CHAPS - при q=2.2 частицы имеют радиус всего 3.9 нм, в то время, как в смесях DMPC/CHAPS при таком соотношении q образуется особая фаза, раствор становится гелеобразным, спектры ЯМР частиц просто не наблюдаются. 3.9 нм соответствуют частицами DMPC/CHAPS q=1.5 при 15 ºC. Сигнал метильной группы ацильных цепей липида уширен и расщеплен на две неравные компоненты, что свидетельствует о неоднородном окружении молекул липида (Рис. 25C), возможно из-за неполной сегрегации липида и детергента. Аппроксимация зависимости R(q) при 27 ºC позволяет получить параметры r=1.24±0.03 нм, λ=2.4±0.1, что согласуется с размером молекул

Façade-EPC. С другой стороны, при 15 ºC получены параметры r=1.6±0.1 нм, λ=3.9±0.4, то есть при температурах ниже фазового переходы DMPC бицеллы на основе Façade-EPC образуются с гораздо более плотной упаковкой липидов и/или менее плотной упаковкой детергента в ободе, чем выше фазового перехода. Такое резкое изменение параметров бицелл может являться индикатором фазового перехода липидного бислоя. Также стоит отметить и особое поведение бицелл DMPC/Façade-EPC при изменении температуры. При q<2, такие частицы скорее уменьшаются, чем растут при нагревании (Рис. 25B), эффект ТЗР наблюдается только для очень больших частиц (R>5нм), с q~3 и достаточно слабо выражен - размер увеличивается на 25% при нагреве до 40 ºC. И Façade-EPC, и Façade-EM способны растворять даже существенный избыток липида, в отличие от CHAPS и DHPC, однако во многом ведут себя по-разному. Единственной общей чертой является пониженная склонность к температурно-зависимому росту частиц, что возможно и объясняет эти качества детергентов Façade. Возможно, причина в возникновении других фаз раствора бицелл DHPC или CHAPS, таких как ламеллярная или гексагональная, происходящее при высоких значениях q. Детергенты Façade образуют бицеллы даже при q>3.

Для Façade-EPC удалось измерить концентрацию детергента в растворе (Рис. 26), используя коэффициенты диффузии липидов и детергентов. Содержание мономерной формы Façade-EPC постепенно снижалось от 1.4 мМ при q=1 до 1.1 мМ при q=3.3. Зависимость от температуры оказалась более ярко выраженной: ниже 20 ºC концентарция Façade-EPC в растворе начинает расти и достигает 3.0 мМ при 10 ºC и q=1.0. Если суммировать данные о поведении бицелл DMPC/Façade-EPC,то использование этого детергента позволяет получить бицеллы с тонким ободом и малым размером, практически полностью устойчивые к ТЗР частиц. При этом, свойства бицелл кардинально разнятся выше и ниже точки фазового перехода DMPC - изменяются параметры модели идеальной бицеллы и концентрация "свободного" детергента, что свидетельствует о различных параметрах упаковки липидов и детергентов и может говорить о фазовом переходе.

Можно заключить, что в рамках работы было впервые предложено использовать детергенты типа Façade для приготовления малых изотропных бицелл. Такие бицеллы оказались устойчивы к температурно-зависимому росту, однако, свойства обода в отношении его взаимодействия с растворимыми частями МБ ещё предстоит изучить (см. ниже).

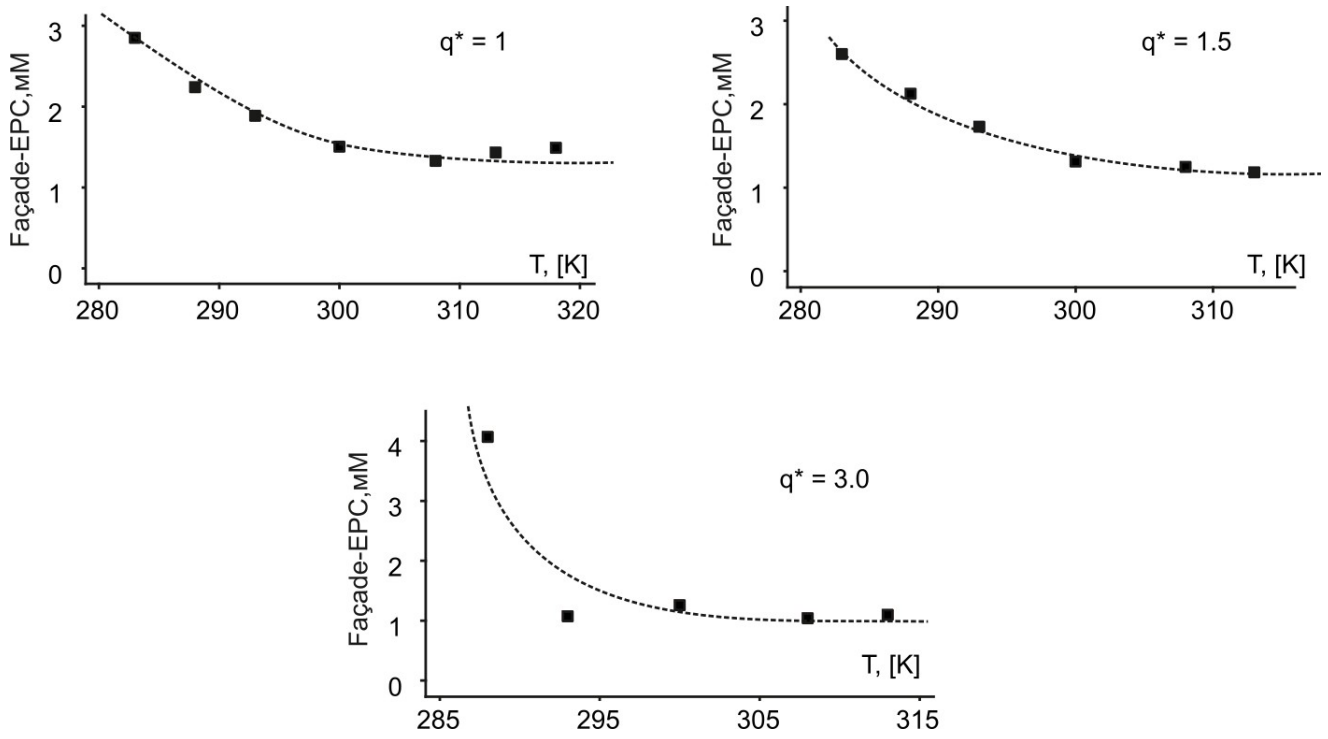

Рисунок 26. Зависимость концентрации мономерного Façade-EPC в растворе бицелл DMPC/ Façade-EPC q=1, q=1.5 и q=3.0 от температуры.

4.6. Параметры бицелл на основе DH_7PC.

Дигептаноилфосфатидилхолин (DH_7PC) чрезвычайно похож на DHPC, отличаясь всего на одно звено CH_2 в ацильной цепи. В силу этого сходства, DH_7PC неоднократно применялся для приготовления бицелл [81,82]. Одним из аргументов в пользу замены DHPC на DH_7PC является в 10 раз более низкая ККМ последнего (1.4 мМ [425]), что позволяет лучше контролировать соотношение q при низких концентрациях липидов. Однако, стоит отметить, что свойства частиц на основе DH_7PC в необходимой мере не исследовались. В одной из работ приведены размеры частиц DMPC/DH_7PC при нескольких q и при одной температуре, однако в то время методы измерения размеров ещё не были достаточно проработанными и измеренные в этой же работе размеры бицелл других составов (DMPC/DHPC) не соответствуют действительности [104]. В этой связи, были приготовлены несколько смесей DMPC/DH_7PC с соотношением q в диапазоне 0.2-0.9, в которых размер бицелл и концентрация свободного детергента были измерены при двух температурах - 20 и 40 ºC (Рис. 27). Как можно увидеть, поведение бицелл DH_7PC кардинально отличается от классических частиц на основе DHPC. При 40 ºC частицы подвержены сильнейшему ТЗР и их размер достигает 19 нм при q=0.84 (менее 4 нм в случае DHPC). С другой стороны, при 20 ºC, частицы оказываются относительно небольшими, однако зависимость R(q) искажена: при q свыше 0.6 частицы начинают

уменьшатся с увеличением q, что в корне противоречит всем возможным моделям идеальной бицеллы. В диапазоне q 0.2-0.6 зависимость можно попытаться аппроксимировать уравнением (7), при этом получаются следующие параметры: λ=1.61±0.14 и r=2.0±0.05 нм. Опираясь на структуру молекулы DH_7PC можно ожидать λ=0.65 и r=1.34 нм, иными словами, зависимость R(q) для бицелл DMPC/DH_7PC не соответствует модели идеальной бицеллы. Вероятнее всего происходит смешивание между липидами и детергентами, которое прогрессирует при увеличении температуры.

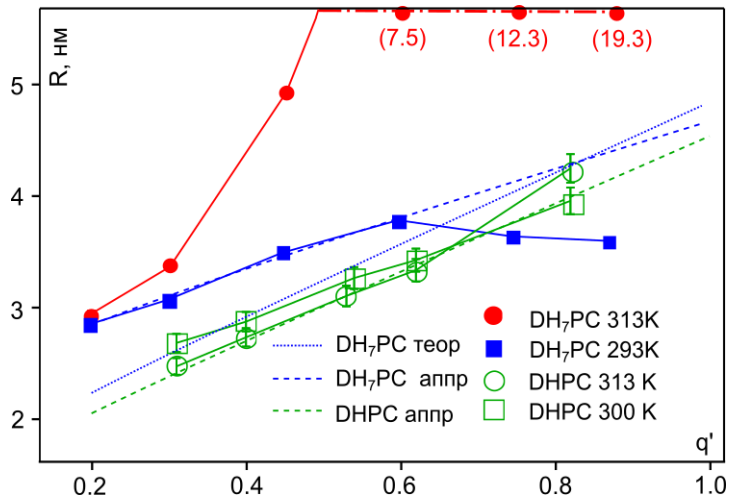

Рисунок 27. Зависимость радиуса частиц в растворе от соотношения q' в смесях DMPC/DH_7PC (заполненные точки) и DMPC/DHPC (пустые точки) при 20 (квадраты) и 40 (круги) ºC. Зелёная пунктирная линия соответствует модели идеальной бицеллы для смесей DMPC/DHPC (уравнение (7)) с параметрами, полученными на основании анализа структуры молекул липида и детергента. Синей пунктирной линией показан аналогичный график для смеси DMPC/DH_7PC. Синей прерывистой линией обозначен результат аппроксимации уравнением (7) зависимости R(q') для частиц DMPC/DH_7PC в диапазоне q 0.2-0.6 при 20 ºC.

Результаты измерений свойств частиц DMPC/DH_7PC позволяют сделать несколько важных выводов. В первую очередь, можно заключить, что DH_7PC не образует бицеллы в смесях с фосфолипидами и не должен использоваться в качестве ободообразующего агента. Во-вторых, полученные данные ярко показывают важность исследования структуры частиц в смесях липидов и детергентов перед их применением в качестве мембраноподобной среды. В-третьих, очевидно, что даже самые незначительные различия в структуре детергентов могут привести к существенному изменению в поведении частиц, сформированных с их участием. Отличие на одно звено CH_2 в ацильной цепи может оказаться критическим для способности детергента образовывать бицеллы, а отличие в полярных группах плоских амфифилов может повлиять на размер бицелл, а также на устойчивость частиц к влиянию температуры, как это

видно на примере детергентов Façade. В-четвёртых, показано, что изучение зависимости R(q) может выявить смеси, которые характеризуются неидеальным поведением и смешиванием между липидом и детергентом. Иными словами, зависимость R(q) может служить критерием "идеальности" бицелл, корректности формирования частиц в растворе. Наконец, можно порассуждать о том, какие свойства молекулы детергента важны, чтобы он мог образовывать обод бицелл. Очевидно, что в первую очередь это низкая смешиваемость между детергентом и липидом в бислое. В случае DHPC и DH_7PC за смешиваемость отвечает длина гидрофобных цепей. У DH_7PC ацильные цепи уже недостаточно коротки, что приводит к увеличению размера частиц и ТЗР. При этом, можно предположить, что дипентаноилфосфатидилхолин, чьи цепи еще короче, мог бы обеспечить лучшие характеристики бицелл, чем DHPC, из-за ещё меньшей смешиваемости. Однако, такой липид будет слишком хорошо растворим в воде, его ККМ составляет уже 90 мМ, что исключает приготовление бицелл в разумных концентрациях. Так что, DHPC оказывается единственным, уникальным в своём классе соединений, фосфолипидом с короткими жирнокислотными остатками, способным к образованию бицелл.

4.7. Параметры бицелл, приготовленных из липидов с варьируемыми ацильными цепями.

Помимо типа ободообразующего агента липидный состав также может являться важнейшим параметром, влияющим на характеристики бицелл. Более того, бицеллы с варьируемым липидным составом необходимы для изучения свойств МБ, в первую очередь потому, что для каждого МБ существует своё нативное окружение, которое зависит от типа клеток и локализации МБ. Во-вторых, понимание механизмов влияния толщины бислоя и заряда клеточной мембраны на стабильность и структуру МБ является фундаментальным знанием, необходимым для создания методов предсказания свойств МБ при помощи компьютерных вычислений. Наконец, измерение параметров бицелл, приготовленных из липидов другой длины послужит для проверки предложенной в работе модели идеальной бицеллы для плоских амфифилов (уравнение (8)). Поэтому, были изучены размеры бицелл на основе четырёх различных липидов и CHAPS: DLPC (насыщенные цепи длиной 12 атомов углерода), DMPC (насыщенные цепи, 14 атомов углерода), DPPC (насыщенные цепи, 16 атомов углерода), POPC (насыщенная цепь из 16 атомов углерода и ненасыщенная цепь длинной 18 атомов углерода, одна двойная связь). Такой набор липидов позволяет исследовать влияние длины ацильных цепей и наличия двойных связей на свойства бицелл. Измерения проводились при двух температурах - 20 и 40 ºС, для регистрации ТЗР, а также в диапазоне q 0.4-1.1. Полученные зависимости показаны на рисунке 28. Как оказалось, все четыре типа бицелл

демонстрируют схожее поведение, при этом температурно зависимый рост практически не наблюдается для частиц из DPPC, и усилен в случае частиц POPC и DLPC. Очевидно, что ТЗР каким-то образом связан с температурой фазового перехода липидного бислоя - чем ниже критическая точка, тем ниже значения q и температуры, при которых начинается ТЗР и тем выше амплитуда эффекта.

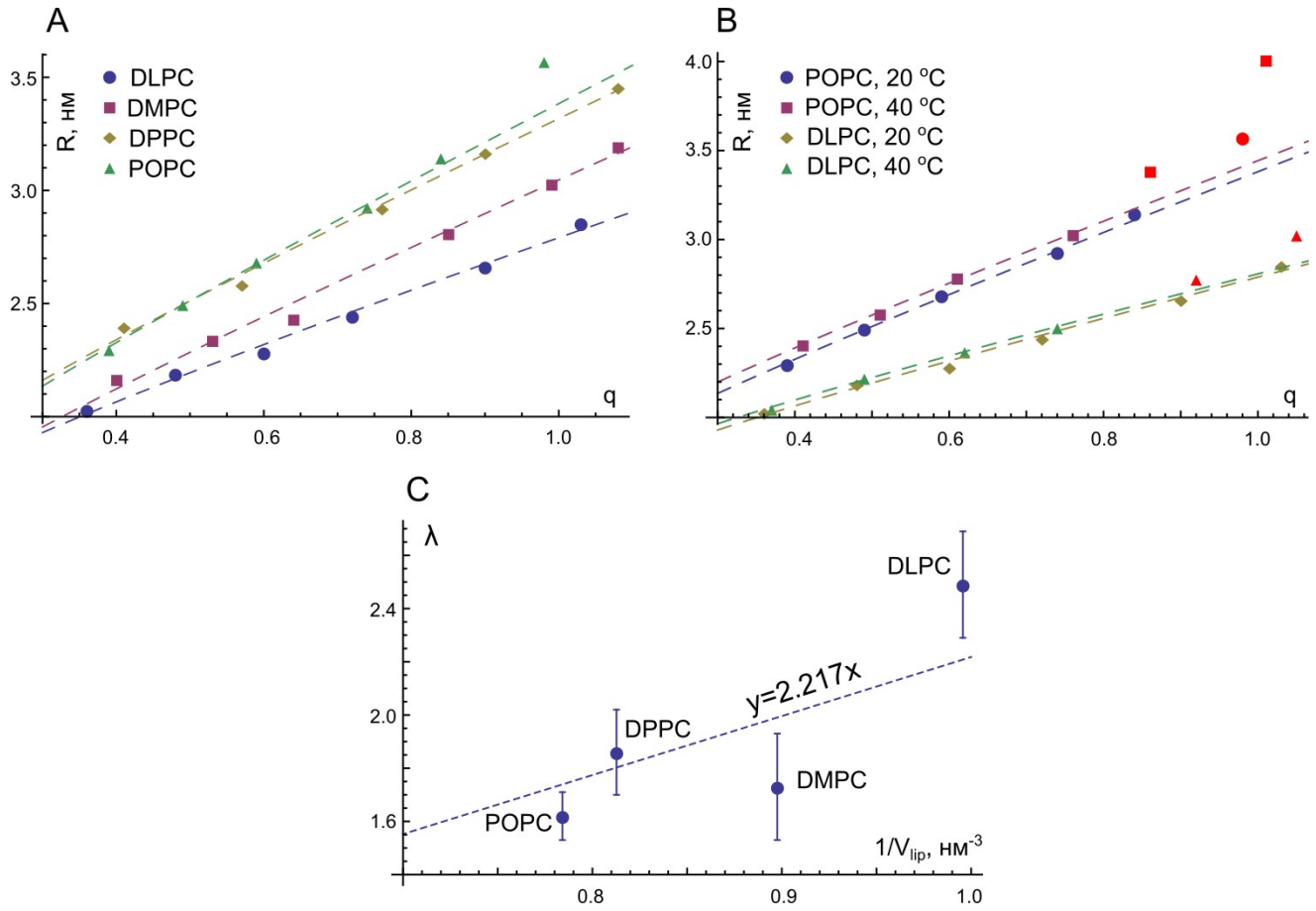

Рисунок 28. A - зависимости R(q), измеренные при 20 °C для бицелл DLPC/CHAPS (синие круги), DMPC/CHAPS (фиолетовые квадраты), DPPC/CHAPS (коричневые ромбы) и POPC/CHAPS (зеленые треугольники). Пунктирными линиями показан результат аппроксимации экспериментальных точек моделью идеальной бицеллы (8). **B -** зависимости R(q), измеренные для бицелл DLPC/CHAPS и POPC/CHAPS при 20 и 40 °C. Пунктирными линиями показан результат аппроксимации экспериментальных точек моделью идеальной бицеллы. Красным обозначены точки, для которых обнаружен выраженный ТЗР. **C -** коэффициент λ уравнения (8) для бицелл на основе различных липидов отображен как функция обратного объема молекулы соответствующего липида в бислое. Линией показан результат аппроксимации точек линейной зависимостью типа y=kx.

Зависимости, полученные при обеих температурах (за исключением точек, в которых наблюдался выраженный ТЗР) были аппроксимированы уравнением (8), результаты представлены в таблице 6. Как можно увидеть, во всех четырёх типах бицелл параметр r

принимает близкие значения - от 1.2 до 1.35 нм, в то время как параметр λ оказывается разным, принимая максимальное значение в случае DLPC, а минимальное - в случае POPC. При этом существенной зависимости параметров модели идеальной бицеллы от температуры в изученном диапазоне q не наблюдается. Стоит отметить, что схожая толщина обода в целом подтверждает модель идеальной бицеллы (8), однако величина λ существенно выше ожидаемой, исходя из массы молекулы CHAPS или исходя из параметров упаковки CHAPS в мицеллах. Компьютерное моделирование показывает, что в мицеллах CHAPS упакован чрезвычайно плотно (свыше 1.3 г/см^3), средний объем молекулы составляет 0.74 нм^3 [416]. Липиды, в свою очередь, характеризуются средним объёмом в бислое от 1.0 нм^3 (DLPC) до 1.3 нм^3 (DPPC) [426]. следовательно, λ - отношение объёмов молекул детергента и липида, ожидается в диапазоне 0.6-0.75. На основе молекулярной массы CHAPS можно ожидать λ в диапазоне 0.8-1.0 при условии одинаковой плотности обода и бислоя, в то время как наблюдаемые значения оказываются в два раза больше. Расхождение между экспериментально измеренными и предсказанными значениями можно объяснить особенностями упаковки CHAPS в ободе бицелл, которая сильно отличается от упаковки детергента в мицеллах. Если CHAPS действительно способен образовывать плоский монослой на границе диска липидного бислоя, когда неполярная сторона детергента взаимодействует с ацильными цепями липидов, то упаковка детергента окажется гораздо более "рыхлой", чем в мицеллах, где такое взаимное расположение молекул CHAPS невозможно. Средний объем молекулы CHAPS в таком монослое можно оценить как площадь наибольшей проекции молекулы (1.34 нм^2), умноженную на толщину обода (1.3 нм), что равняется 1.74 нм^3, что близко к экспериментальному значению, которое можно измерить, построив зависимость λ от обратного объёма молекулы липида и аппроксимировать полученные точки прямой типа y=kx, где коэффициент k будет соответствовать объёму молекулы CHAPS в ободе бислоя. Такая зависимость показана на рисунке 28C. Видно, что объем липида коррелирует с коэффициентом λ, а объем молекулы CHAPS при этом составляет 2.22±0.14 нм^3. Если обобщить все данные, полученные нами при помощи модели (8) для детергентов CHAPS, CHAPSO и Façade, то можно заключить, что параметр λ коррелирует с массой молекулы детергента с коэффициентом, близким к 1, а также с обратным объёмом липида с коэффициентом 2.22. Наличие этих корреляций является важным косвенным свидетельством в пользу предложенной модели идеальной бицеллы для плоских амфифилов.

Таблица 6. Параметры бицелл на основе CHAPS и параметры бислоев из соответствующих липидов.

	λ	r, нм	S_0 [a], нм^2	D_B' [b], нм
DLPC/CHAPS (20/40℃)	2.48±0.2/ 2.64±0.16	1.30±0.04/ 1.33±0.02	0.608	3.97
DMPC/CHAPS (27 ℃)	1.73±0.2	1.20±0.06	0.599	4.37
POPC/CHAPS (20/40℃)	1.61±0.09/ 1.69±0.08	1.29±0.03/ 1.34±0.03	0.643	4.68
DPPC/CHAPS (27 ℃)	1.85±0.16	1.35±0.05	0.6[c]	4.65

[a] средняя площадь поверхности на одну молекулу липида в бислое в соответствии с работой [426] при 30 ºС.
[b]стерическая толщина бислоя, толщина углеводородной части D_c [426] с добавлением 1.8 нм на объем головной группы [413] при 30 ºС.
[c]оценка для бислоя DPPC в жидко-кристаллическом состоянии при 30 ºС.

4.8. Оптимальные методы приготовления бицелл, методы контроля размера частиц.

Описанные выше эксперименты показывают, что методика измерения величины бицелл оказалась универсальной и может применяться для смесей различного состава. В этой связи, можно рассмотреть несколько методологических вопросов: правильный способ приготовления растворов бицелл и метод контроля за размером частиц при разбавлении. В отношении методов приготовления достаточно давно сформировалось предубеждение, что бицеллы необходимо подвергать нескольким циклам заморозки с последующим оттаиванием в ультразвуковой бане. В большинстве работ, связанных с изучением структуры МБ в бицеллах, упоминается именно такой способ приготовления мембраноподобной среды. Дополнительно, можно найти работы, где утверждается, что средний радиус изотропных бицелл DMPC/DHPC, приготовленных при одном и том же соотношении q, оказывается различным без и с применением циклов заморозки/ оттаивания [104]. Однако, данное утверждение противоречит опыту автора - как показывает практика, при добавлении липида в виде липосом или детергента в виде мицелл к бицеллам, изменение размера частиц и переход в состояние равновесия происходит в течение нескольких минут без каких-либо дополнительных манипуляций. К тому же, не все белки могут выдержать замораживание и оттаивание. Это ограничивает круг возможных объектов при использовании такого подхода, что является крайне нежелательным. Поэтому, было изучено формирование

изотропных бицелл малого размера при различных схемах пробоподготовки. Были сделаны два образца бицелл DMPC/CHAPS с q'=1.5, один из них был подвергнут шести циклам заморозки и оттаивания, второй образец интенсивно встряхивали в течение 10 минут при 30 ºС. Результат измерения показан на рисунке 29. Спектры ^{1}H двух образцов оказались практически идентичными, однако коэффициенты диффузии, полученные после шести последовательных измерений при 27 ºС оказались статистически различны: 5.28±0.02 и 5.36±0.02 см^2/с ($p<0.001$). Данное различие является незначительным (около 1.5 %), и, более того, коэффициент диффузии бицелл второго образца не изменяется, если образец также подвергнуть циклам заморозки/оттаивания. Таким образом, замораживание/оттаивание не является обязательной процедурой при приготовлении бицелл, которые можно получить встряхиванием образца в течение 10 минут при температуре выше критической точки используемого фосфолипида.

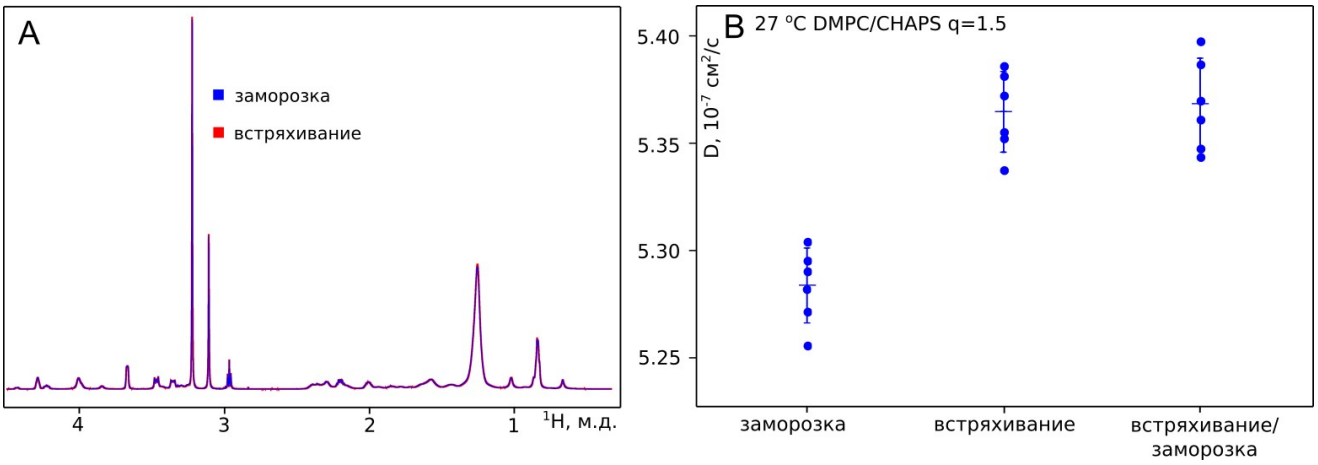

Рисунок 29. А - суперпозиция спектров ^{1}H образцов бицелл DMPC/CHAPS q=1.5, полученных при 27 ºС для образца, приготовленного с использованием 6 циклов заморозки (показан синим) и для образца, полученного после интенсивного встряхивания (красным). **В** - показаны результаты измерения коэффициентов диффузии бицелл в двух образцах, а также в образце 2 после применения к нему 6 циклов заморозки.

Второй вопрос касается увеличения размера бицелл, которое происходит в низких концентрациях. Так, было показано, что при разбавлении бицеллы начинают расти и в конце концов превращаются в перфорированные бислои [105], из-за того, что часть детергента всегда находится в растворе, и при низких концентрациях эффективное соотношение q', которое определяет размер бицелл согласно моделям (7) и (8), начинает слишком сильно отличаться от номинального соотношения q. В одной из недавних работ [105] прозвучала рекомендация не использовать бицеллы DMPC/DHPC q=0.5 в концентрации ниже 120 мМ. Стоит отметить, что по ряду причин ограничение снизу концентрации бицелл является нежелательным при

проведении структурных исследований. (1) В таких работах чаще всего используются дейтерированные аналоги липидов и детергентов, которые чрезвычайно дороги. (2) При исследовании димеризации МБ необходимо поддерживать низкое соотношение липид/белок, а поскольку количество получаемого белка обычно ограниченно (также по экономическим причинам) это равнозначно использованию низких концентраций бицелл. Стандартная концентрация белка при скрининге параметров окружения составляет 0.1 мМ, поэтому хотелось бы иметь возможность готовить бицеллы в концентрациях 5-6 мМ, чтобы поддерживать соотношение 1 белок на бицеллу. (3) При высоких концентрациях вращательная диффузия бицелл замедляется, что приводит к уширению линий сигналов в спектрах ЯМР и потере чувствительности [178]. В связи со сказанным выше, предлагается применить на практике полученную ранее информацию о концентрации детергентов в растворе для создания методики приготовления бицелл контролируемого размера в низких концентрациях. Процесс формирования бицелл схож с процессом мицеллообразования, поэтому, можно ожидать, что в отсутствии смешивания между липидами и детергентами (то есть, если сорбцией молекул детергента на поверхности бислоя можно пренебречь), концентрация мономерного детергента в растворе будет слабо зависеть от общей концентрации бицелл. Тогда, если при приготовлении смеси скорректировать количество детергента, с учётом концентрации последнего в растворе, то можно рассчитывать получить смесь с заданным соотношением q', даже если q будет существенно другим. Чтобы показать применимость такого подхода, мы приготовили несколько образцов бицелл q=0.5 DMPC/DHPC, q=0.5 DMPC/CHAPS и q=1 DMPC/CHAPS и провели серию экспериментов по их разбавлению при 40 ºС. Во всех трех случаях, начальные образцы, содержавшие 200 мМ бицелл разбавлялись или чистой водой или растворами, содержащими 8 мМ DHPC или 3.3 мМ CHAPS (в случае q=1) или 6 мМ CHAPS (q=0.5), что соответствует значению $[Det]_{free}$ при заданных q'. Как ожидалось, размер и соотношение q' сохранялось при разбавлении раствором детергента, в то время как частицы увеличивались при разбавлении водой (Рис. 30), при этом бицеллы DMPC/CHAPS удалось разбавить до концентрации 1.3 мМ с сохранением размера. Стоит отметить, что все три серии идеально описывались уравнением (11) с параметром λ=0.98-1.00. Поскольку уравнение (11) и подход для определения $[Det]_{free}$, никак взаимно не связаны, этот факт является доказательством как в пользу того, что уравнение (11) можно использовать для измерения размера бицелл с параметром λ=1, так и подтверждает точность предложенного метода оценки концентрации свободного детергента в растворе.

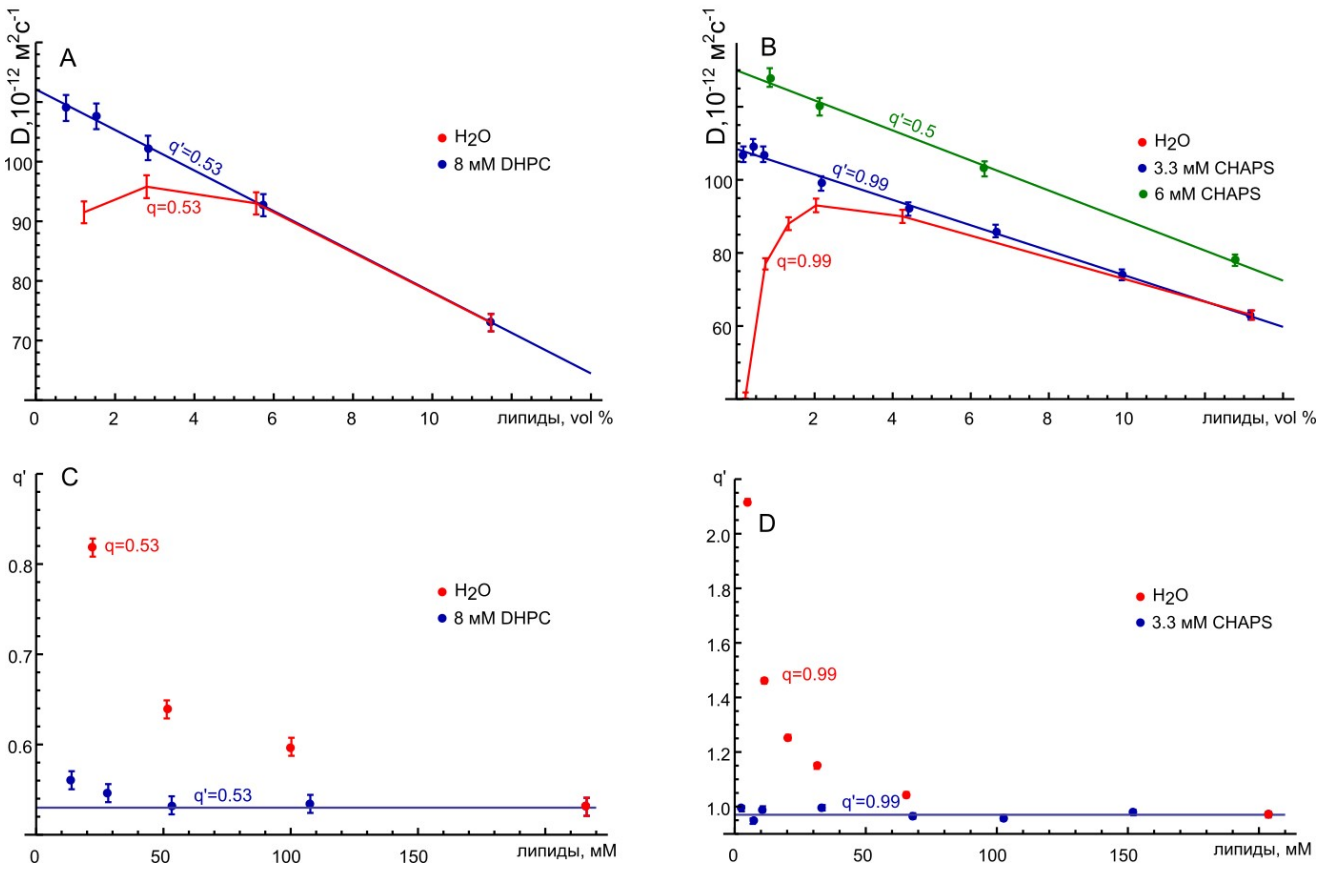

Рисунок 30. A,B - зависимость коэффициента диффузии бицелл от концентрации липидов для бицелл DMPC/DHPC q=0.53 (A) и DMPC/CHAPS (B) q=0.5 (показано зеленым) и q=0.99 (показано синим икрасным), полученных разбавлением начального образца водой (красные точки) или раствором $[Det]_{free}$ (синие и зеленые точки). Прямые линии соответствуют аппроксимации точек уравнением (11). C,D - зависимость эффективного соотношения q' от концентрации липидов в бицеллах для бицелл DMPC/DHPC q=0.53 (C) и DMPC/CHAPS q=0.99 (D), полученных разбавлением начального образца водой (красные точки) или раствором $[Det]_{free}$ (синие точки). Прямые показывают значение q=0.53 и q=0.99. Все эксперименты проводились при 40 ºC.

Дополнительно, предположения подтверждаются видом спектров ^{1}H - форма сигнала от метильной группы не меняется при разбавлении раствором $[Det]_{free}$, хотя форма и положение сигнала от детергента изменяется существенно (Рис. 31). В то же время, при разбавлении водой, сигнал метильной группы начинает заметно уширяться. Конечно, необходимо признать, что при низких концентрациях частиц, когда количество липидов оказывается сопоставимым с количеством свободного детергента в растворе, размер бицелл контролировать гораздо сложнее, поскольку небольшая ошибка в концентрации детергента может привести к существенной ошибке в размере бицелл. Однако, даже в случае возникновения такой проблемы, достаточно

легко подстроить q' до нужной величины титрованием раствором детергента. Резюмируя, можно предложить следующий рецепт для приготовления бицелл: рассчитать количества липида и детергента, нужные для желаемого соотношения q, затем добавить дополнительно детергент, чтобы скомпенсировать $[Det]_{free}$ (таблицы 2-5), с учётом желаемого объёма образца и температуры.

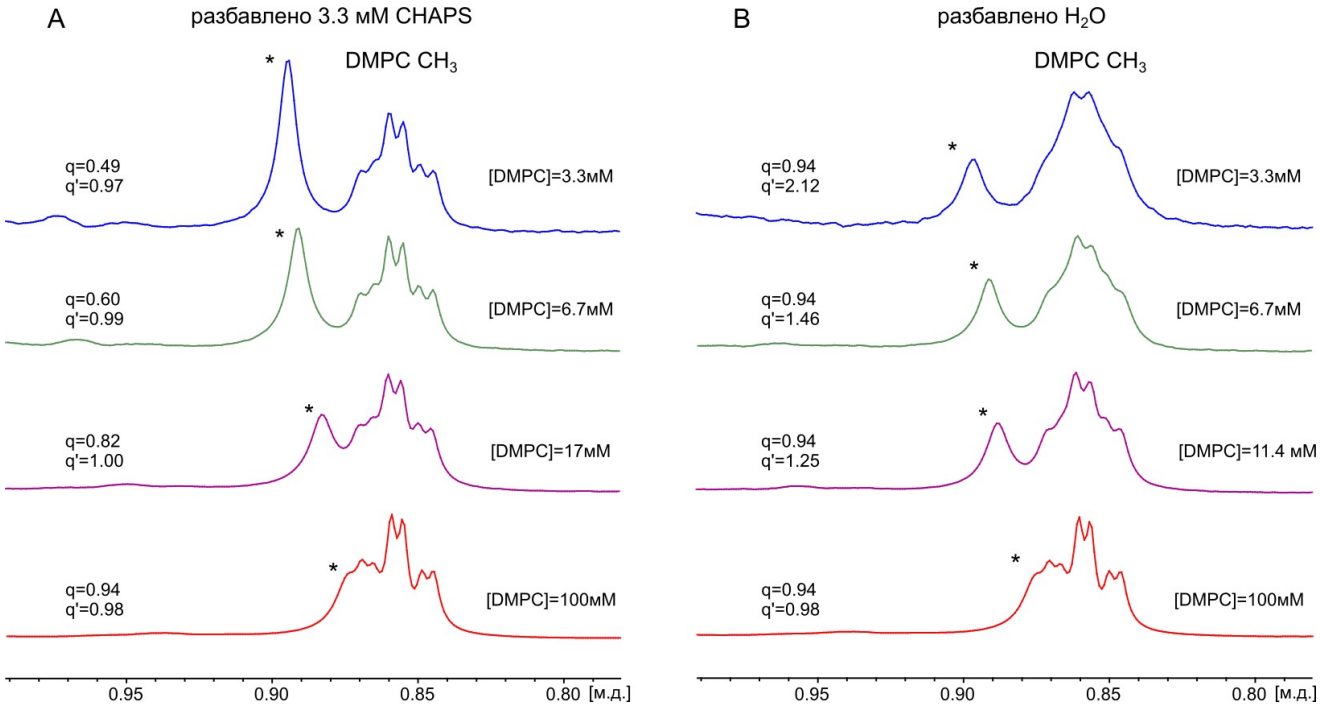

Рисунок 31. Фрагменты спектров ^{1}H ЯМР бицелл DMPC/CHAPS q'=0.99 (A) и q=0.94 (B), полученных при различных концентрациях липида. Сигналы метильных групп липида и детергента отмечены DMPC CH_3 и *, соответственно. Спектры получены при 40 ºC, pH 7.0.

4.9. Характеристики бицелл со встроенным ТМ белком.

4.9.1. Влияние белка на структуру бицеллы.

Еще один важный вопрос в отношении структуры бицелл - что происходит с частицами при встраивании в них мембранного белка. До сих пор обсуждалась только структура "пустых" бицелл, бицеллы в присутствии белка могут формироваться по другому принципу. Поэтому, было принято решение измерить радиусы бицелл после встраивания в них модельного белка, в качестве которого был выбран ТМ домен рецепторной киназы TrkA (TrkAtm). Известно, что белок состоит из 39 а.о. и в мембраноподобном окружении формирует α-спираль. Стоит отметить, что радиус бицелл с белком нельзя измерить, используя трансляционную диффузию молекул липида, поскольку невозможно добиться равномерного распределения, когда на

каждую бицеллу будет приходиться ровно одна молекула белка. Поэтому, оценивать размер бицелл необходимо, опираясь на диффузию белка. При этом, трансляционную диффузию МБ также оказывается сложно измерить из-за низкой чувствительности импульсных последовательностей с гетероядерной фильтрацией, поэтому предлагается использовать вращательную диффузию. Для изучения скорости вращательной диффузии массивных объектов лучше всего подходит эксперимент для измерения кросс-скорелированной релаксации ^{15}N (упоминается в разделе 1.3.1), который позволяет получить параметр η_{xy}, в первом приближении пропорциональный времени корреляции вращательной диффузии. Стоит отметить, что вращательная диффузия дисковидных бицелл должна быть анизотропна, тензор диффузии аксиально симметричный, и η_{xy} зависит от трёх характерных времён. Однако, в случае ТМ α-спирали все N-H векторы ТМ домена оказываются направленными в одну сторону и на релаксацию амидных групп не влияют вращения вокруг оси, соответствующей главной оси диска бицеллы, поэтому на измеряемый эффект оказывает влияние только одно характерное время: $\tau_a = 1/6 D_\perp$, которое описывает вращение бицеллы вокруг двух медленных осей эллипсоида инерции.

$$\eta_{xy} = \rho\sigma 4 J(0)(3\cos^2\theta - 1) \simeq 1.4\rho\sigma\tau_a \quad (14),$$

где $\rho = (\mu_0/4\pi)\gamma_H \gamma_N h/(4\pi r_{NH}^3)$, $\sigma = \gamma_N B_0 \delta_N/3$, γ_N и γ_H - гиромагнитные соотношения для ядер ^{15}N и ^{1}H, r_{HN} - межъядерное расстояние ^{1}H-^{15}N, h - постоянная Планка, B_0 - напряжённость внешнего магнитного поля, δ_N - анизотропия химического сдвига (АХС) ^{15}N, в предположении, что угол θ между связью ^{1}H-^{15}N и тензором АХС в α-спиралях [299]. Измерив таким образом τ_a, можно получить радиус бицелл, применив коррекцию на форм-фактор:

$$\tau_a/\tau_0 = 1.18 + 0.1744(\ln p + 0.2877)^2 - 0.2417(\ln p + 0.2877)^3 - 3.882\times10^{-2}(\ln p + 0.2877)^4,\ p < 0.75 \quad (15)$$

где p - соотношение размеров h/2R, а τ_0 - время корреляции диффузии сферы эквивалентного объема: $\pi h^3 \eta/4 p^2 kT$ [417]. Также необходимо учитывать, что аналогично трансляционной диффузии, вращательная диффузия частиц замедляется из-за повышенной концентрации [427], поэтому τ_a необходимо скорректировать прежде, чем решать уравнение (15):

$$\tau_a^0 = \tau_a(1 - 0.63\Phi - 0.74\Phi^2) \quad (16).$$

Таким образом, используя уравнения (14)-(16) можно получить радиус бицелл со встроенным белком на основе скоростей кросс-коррелированной релаксации ^{15}N-^{1}H, в предположении, что белок неподвижен внутри бицеллы, бицелла имеет дисковидную форму и

белок ориентирован вдоль нормали липидного бислоя и находится в окружении липидов, а не детергентов.

Для экспериментальной проверки высказанных предположений необходимо задать модель идеальной бицеллы. Проще всего это сделать, решив модифицированное уравнение (4), подставив правильные выражения для объёма обода в случае бицелл на основе плоских амфифилов и бицелл на основе DHPC:

$$q' = \frac{V_{disc} - S_{prot} h}{V_{rim}} \lambda \qquad (17).$$

Здесь S_{prot} - площадь, занимаемая белком на поверхности бислойной части бицеллы, остальные обозначения аналогичны уравнению (4). Для ТМ α-спирали S_{prot} можно оценить как 1.5 нм^2.

Для исследования влияния белка на размер бицелл ^{2}H-^{15}N меченный TrkAtm был встроен в бицеллы DMPC/DHPC и DMPC/CHAPS, измерения проводились при двух температурах, 27 и 40 ºC. Эксперименты со смесями DMPC/CHAPS, показали, что частицы ведут себя в соответствии с предсказанием (уравнение (17) с параметрами λ и r, соответствующими "пустым" бицеллам) в диапазоне q 0.7-1.0 (Рис. 32). При q<0.7 радиус бицелл оказывается слегка выше ожидаемого, чему можно предложить два объяснения. Во-первых при q<0.7 форма частиц оказывается близкой к сферической, вращательная диффузия частиц становится изотропной и выражения (14)-(15) становятся неприменимы. Во-вторых, формулируя уравнение (17), мы предполагаем, что соотношение q одинаково для частиц с белком и частиц без белка, которые одновременно присутствуют в растворе. Однако, это предположение не обязательно верно, если наличие белка влияет на параметры упаковки липидов и свободную энергию детергента в ободе. В этом случае, две популяции бицелл будут формироваться с различным q при сохранении среднего отношения. Это может наблюдаться в случае малых бицелл, когда количество молекул липида недостаточно велико, чтобы полностью окружить гидрофобную поверхность белка. При q>1.0 радиус бицелл оказывается выше ожидаемого, наблюдается температурно-зависимый рост.

В случае DMPC/DHPC радиус бицелл с белком и без него оказывается одинаковым при q=0.3-0.4, в то время, как при q>0.5, радиус бицелл с белком, измеренный из η_{xy}, оказывается всегда ниже, чем радиус бицелл без белка, что неожиданно. Можно предложить несколько объяснений данному эффекту. Во-первых, бицеллы с белком могут действительно быть меньше, чем бицеллы без белка, хоть это и противоречит модели (17). Однако, по данным

трансляционной диффузии средний размер бицелл DMPC/DHPC q=0.5 в присутствии белка оказывается на 0.3 нм выше, что противоречит этой гипотезе. С другой стороны, могут не выполняться предположения, на которых основана методика измерения размера бицелл с белком. Так, белок может не двигаться монолитно вместе с бицеллой, а иметь дополнительную подвижность в нс диапазоне. В этом случае вращательная диффузия белка будет быстрее диффузии бицеллы, что приведёт к наблюдаемому уменьшению размера бицелл. Данное объяснение выглядит более вероятным.

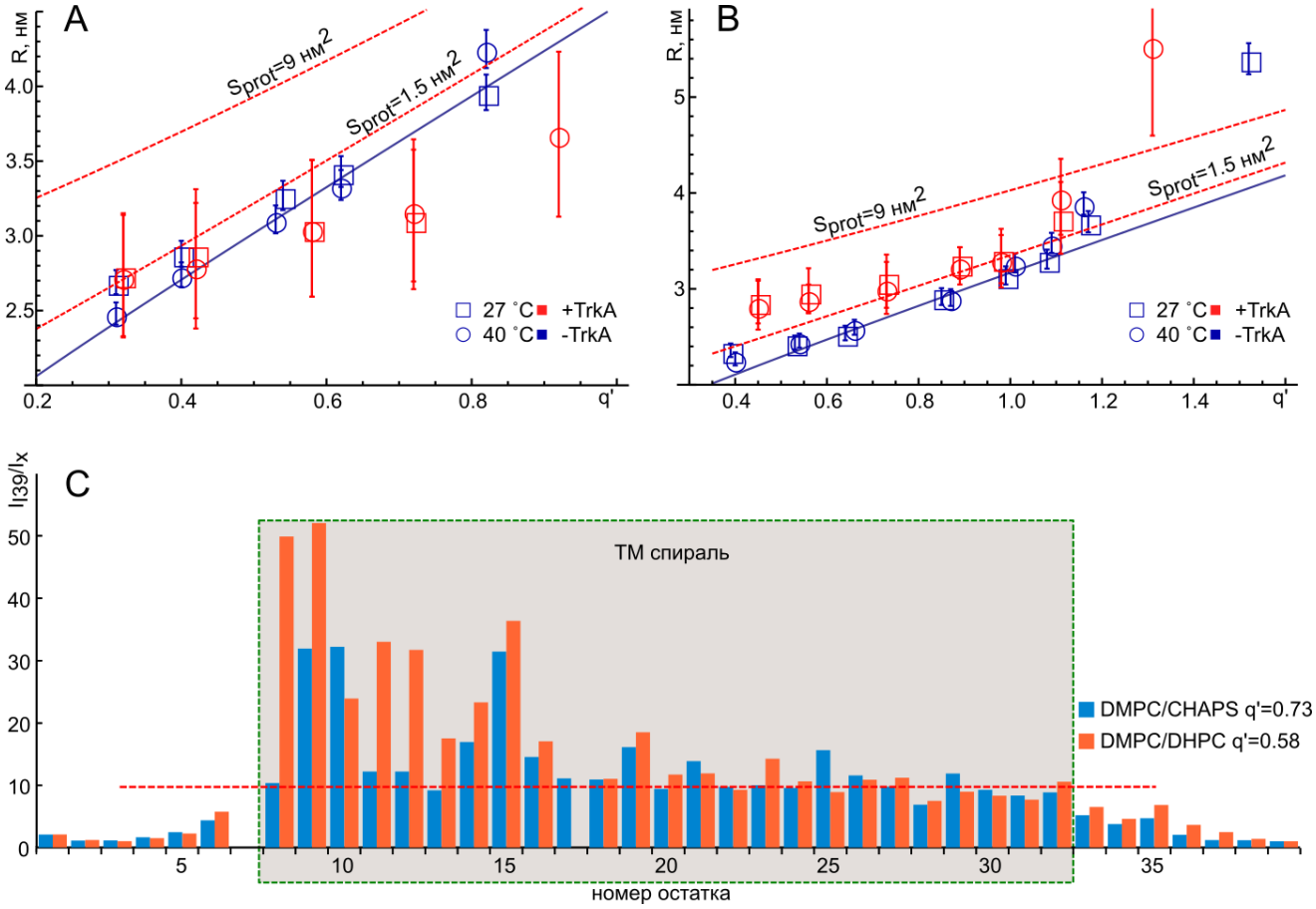

Рисунок 32. А, В - зависимость радиуса бицелл от q смеси DMPC/DHPC (А) и DMPC/CHAPS (В) в присутствии TrkAtm (показаны красным) и в отсутствие белка (синим), при 27 (квадраты) и 40 (круги) °C. Прерывистые красные линии соответствуют решению уравнения (17) с параметрами S_{prot} =1.5 (одна ТМ спираль) и 9 (6 спиралей) нм^2, остальные параметры уравнения соответствуют таковым для бицелл без белка. Синими линиями показаны зависимости R(q) для идеальных бицелл (уравнения (7) и (8)). **С** - отношения интенсивности кросс-пика от остатка I39 в спектрах [^{1}H,^{15}N]-TROSY к интенсивностям других остатков белка TrkAtm, встроенного в бицеллы DMPC/CHAPS q'=0.73 (синие полоски) и DMPC/DHPC q'=0.58 (красные полоски). Серым показана область ТМ α-спирали, красной прерывистой линией показано среднее отношение для С-концевой части ТМ спирали.

4.9.2. Структура и динамика ТМ домена внутри бицелл различного состава.

Раздел 4.9.1. показывает, что не только белок влияет на характеристики бицелл, но и тип бицелл может влиять на поведение белка. Иными словами, ТМ домен может выступать сенсором параметров упаковки липидов и детергентов в бицелле. Чтобы изучить свойства ТМ белка внутри бицелл различного состава, были проанализированы спектры $^{1}H,^{15}N$-TROSY TrkAtm в бицеллах DMPC/DHPC и DMPC/CHAPS. Положение сигналов белка практически не отличаются в двух средах, изменения обобщённых химических сдвигов ($\Delta CS=\sqrt{\Delta\delta H^2+\Delta\delta N^2/36}$ [428]) незначительны и наблюдаются в основном на концах α-спиралей (Рис. 33). Практически никаких изменений не замечено в центральной части ТМД, остатков 15-28 (ΔCS<0.02 м.д.), контакты ЯЭО между амидными протонами, а также времена корреляции вращательной диффузии указывают на то, что вторичная структура TrkAtm не зависит от выбора ободообразующего агента, трансмембранная α-спираль образуется на участке 8-34.

Поскольку концентрация белка различалась в образцах, предлагается использовать отношение интенсивностей кросс-пиков в спектре $^{1}H,^{15}N$-TROSY к интенсивности кросс-пика С-концевого остатка для оценки вклада медленных движений (диапазон мкс-мс) в поперечную релаксацию амидных групп. С-концевой остаток является наиболее мобильным, интенсивность кросс-пика от его амидной группы практически не зависит от размера и типа бицелл, поэтому описанная процедура может рассматриваться как нормировка интенсивностей пиков на концентрацию белка. В случае, если медленные движения отсутствуют, все кросс-пики от трансмембранных остатков должны иметь схожую интенсивность, в то время, как при наличии медленных движений, часть кросс-пиков будут уширены, интенсивность их сигналов будет понижена. Для проведения такого анализа были выбраны два образца бицелл с одинаковой вращательной диффузией белка: DMPC/CHAPS q'=0.73 (τ_a=18.1±1 нс), и DMPC/DHPC q'=0.58 (τ_a=18.6±1 нс). В обоих случаях, на С-концах ТМ спиралей (остатки 16-32) наблюдались одинаковые относительные интенсивности сигналов, было обнаружено существенное уширение линий пиков остатков в первых двух витках α-спирали, при этом эффект был выражен гораздо сильнее в случае бицелл DMPC/DHPC (рис. 32С). Сигналы всего трёх а.о. были уширены в растворе DMPC/CHAPS, в то время как в смеси DMPC/DHPC все 8 N-концевых а.о. спирали характеризовались широкими кросс-пиками. Таким образом, можно заключить, что в бицеллах DMPC/DHPC ТМ белок оказывается существенно дестабилизирован по сравнению с DMPC/CHAPS. TrkAtm оказывается подвижным как в пс-нс диапазоне, что приводит к

ускорению вращательной диффузии белка, так и в диапазоне мс-мкс, что проявляется в уширении кросс-пиков в спектрах ^{1}H,^{15}N-TROSY. Эти эффекты либо не наблюдаются, либо ослаблены, в растворе DMPC/CHAPS.

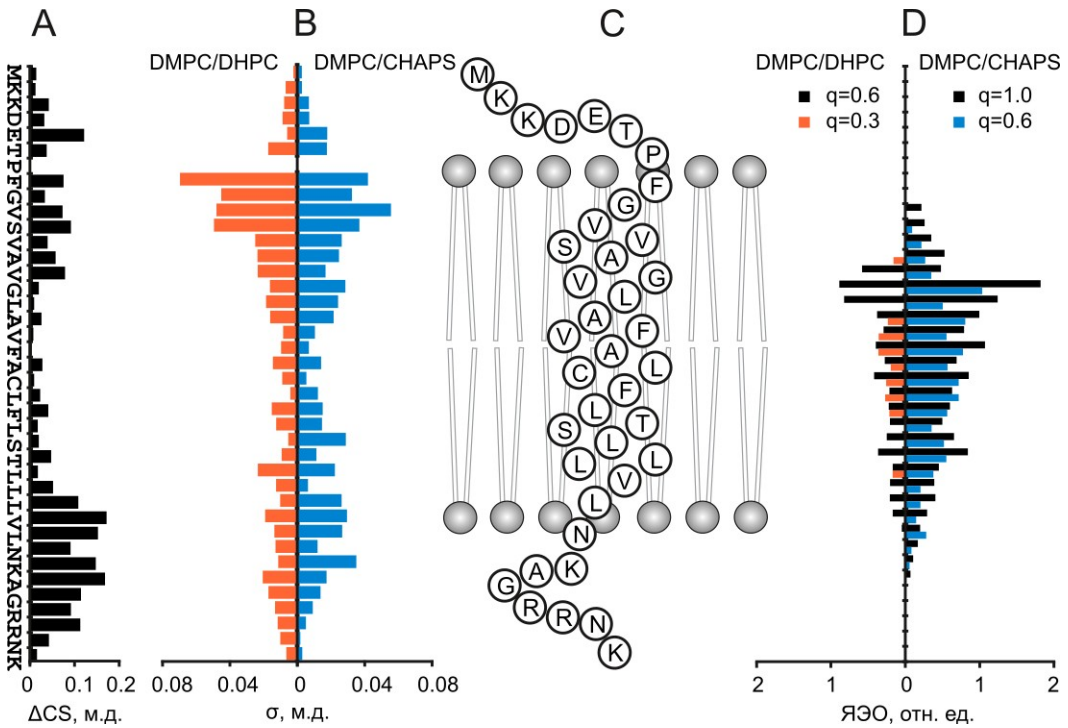

Рисунок 33. A - разница обобщённых химических сдвигов сигналов амидных групп TrkAtm $\Delta CS=\sqrt{\Delta\delta H^2+\Delta\delta N^2/36}$ в бицеллах DMPC/DHPC q'=0.58 и DMPC/CHAPS q'=0.73. **B** - среднеквадратичные отклонения химических сдвигов TrkAtm ($\sigma=\sqrt{\sigma^2(\delta H)+\sigma^2(\delta N)/36}$), наблюдаемые в бицеллах DMPC/DHPC (показаны красным) и DMPC/CHAPS (показаны синим), образованных при различных соотношениях q'. **C** - схематическое изображение ТМ α-спирали TrkAtm по данным спектроскопии ЯМР. **D** - нормированная интенсивность кросс-пиков ЯЭО между амидными протонами TrkAtm и CH_2-группами липидов (1.25 м.д.), наблюдаемых в спектрах 3D-^{1}H,^{15}N-NOESY-HSQC ^{2}H,^{15}N-меченого белка, встроенного в бицеллы DMPC/CHAPS (q=0.6 и q=1.0) и DMPC/DHPC (q=0.3 и q=0.6).

Другой вопрос, который необходимо рассмотреть, касается влияния размера бицелл на структуру белка. В этой связи были изучены химические сдвиги TrkAtm, встроенного в бицеллы, приготовленные с различными отношениями q'. Оказалось, что изменения химических сдвигов сигналов из-за вариации q' являются незначительными (Рис. 33B) и происходят в основном на краях α-спиралей (остатки 8-15 и 27-35), картины изменений очень схожи в бицеллах DMPC/DHPC и DMPC/CHAPS. Отметим, что сигналы всех амидных протонов сдвигаются в одну и ту же сторону при изменении q'. Когда q' и размер частиц увеличиваются, амидные протоны сдвигаются в область слабого поля (Рис. 34). Поскольку химические сдвиги протонов пептидных связей в белках зависят в первую очередь от длин водородных связей, в образовании которых данный протон участвует и характер зависимости известен [340], можно

заключить, что ТМ α-спирали слегка укорачиваются при увеличении q'. Это можно интерпретировать, как уменьшение толщины бислоя при увеличении размера бицелл.

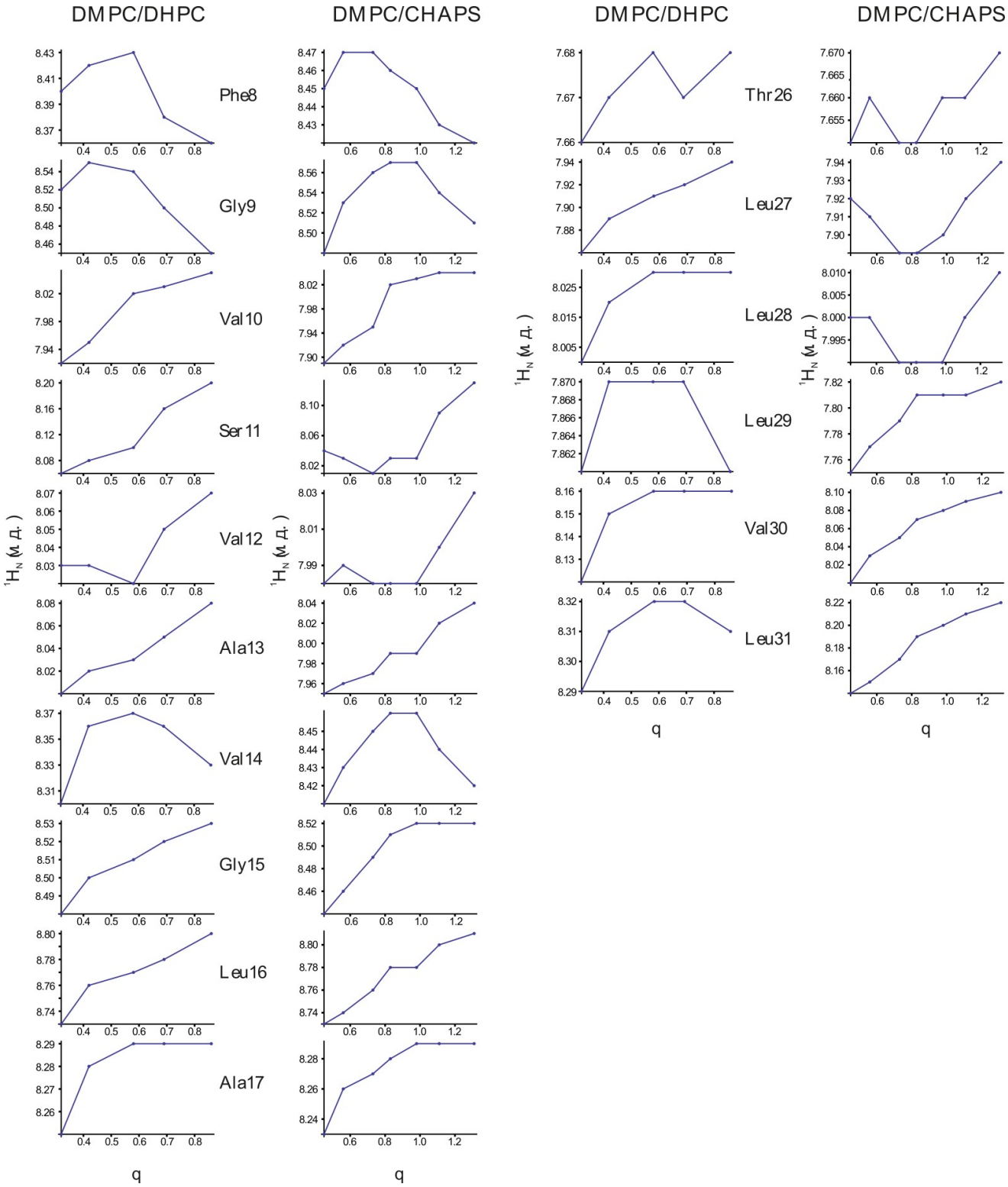

Рисунок 34. Зависимость химических сдвигов амидных протонов остатков ТМ α-спирали TrkAtm от соотношения q бицелл DMCP/DHPC и DMPC/CHAPS.

4.9.3. Взаимодействия белок-липид

Наконец, помимо структуры белка, встроенного в бицеллы, и структуры самих бицелл, важным параметром системы являются взаимодействия белок/липид и состояние липидов в частицах. Чтобы изучить данный вопрос, были получены спектры 3D $^{1}H,^{15}N$-NOESY-HSQC образцов $^{2}H,^{15}N$-TrkA в бицеллах DMPC/DHPC (q'=0.32, 0.58) и DMPC/CHAPS (q'=0.56 и 0.98), в которых были измерены интенсивности межмолекулярных кросс-пиков липид/белок.

Дейтерирование боковых цепей белка позволяет получить достоверно межмолекулярные сигналы между амидными протонами TrkA, которые были получены методом обратного обмена в смеси ТФЭ/вода, и ацильными цепями липидов. Основной целью эксперимента было выяснить, только ли фосфолипиды находятся в непосредственном окружении белка. Во всех четырёх образцах были обнаружены сигналы исключительно на CH_2 группы (1.25 м.д.) и на концевые метильные группы (0.86 м.д.) ацильных цепей. То есть, в основном именно фосфолипиды находятся вблизи ТМ домена, содержание детергента слишком мало, смешивание между липидом и детергентом отсутствует (Рис. 35). Помимо этого, интенсивность пиков белок/ липид может многое сказать о подвижности и упаковке липидов в окрестности белка. ЯЭО пропорционален выражению τ_C/r^6, где r и τ_C - длина и время вращательной корреляции вектора, соединяющего два ядра, между которыми наблюдается взаимодействие. Таким образом, поскольку расстояние белок-липид примерно одинаковое во всех типах частиц, интенсивность межмолекулярных контактов ЯЭО в бицеллах должна в первую очередь определяться подвижностью липидов. Чтобы оценить эффект, интенсивности кросс-пиков ЯЭО были нормированы на интенсивность диагонального пика, чтобы избавиться от влияния поперечной релаксации и медленных движений, а также на параметр τ_a, полученный из кросс-скоррелированной релаксации амидных групп, чтобы исключить зависимость от размера бицеллы. Полученные профили интенсивностей кросс-пиков белок/липид для четырёх смесей показаны на рисунке 33D. Видно, что независимо от соотношения q', в бицеллах на основе DHPC величина ЯЭО белок/липид в два раза ниже, чем в бицеллах на основе CHAPS. Иными словами, в бицеллах DMPC/DHPC липиды оказываются более подвижными, чем в бицеллах DMPC/CHAPS. Схожее наблюдение было сделано в недавней работе, в которой подвижность липидов оценивалась напрямую, с использованием параметров релаксации ядер ^{13}C [421], и это также согласуется с поведением TrkAtm в бицеллах на основе DHPC, где наблюдается повышенная подвижность в пс-нс и мкс-мс диапазонах.

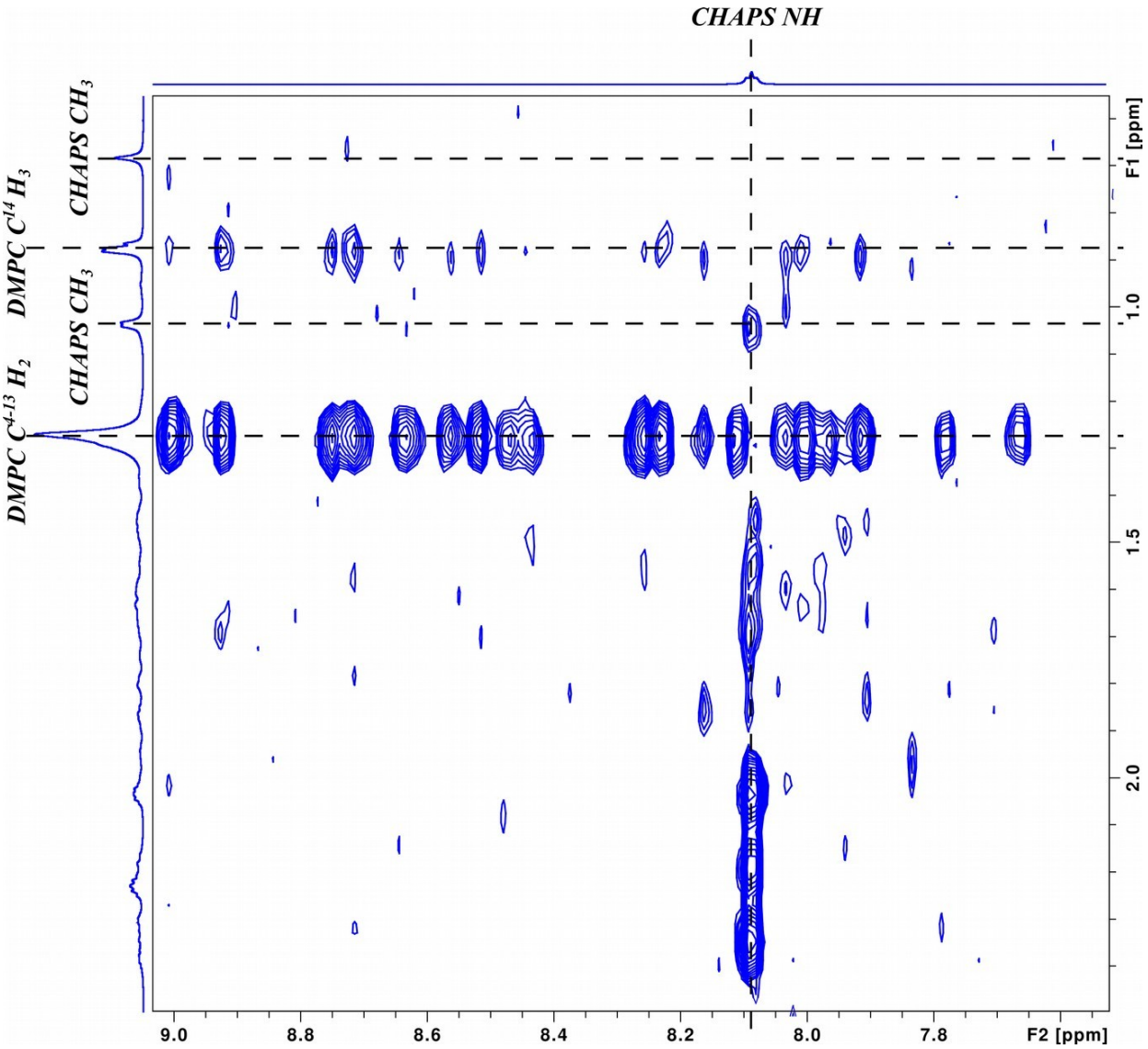

Рисунок 35. Двумерная проекция спектра 3D-^{1}H,^{15}N-NOESY-HSQC (время смешивания 200 мс), зарегистрированного для ^{15}N,^{2}H-TrkAtm в бицеллах q'=0.56 DMPC/CHAPS. Спектр получен при 40 ºC. Слева и сверху показаны соответствующие участки одномерного спектра ^{1}H. Горизонтальные пунктирные линии обозначают положения основных сигналов от метильных и метиленовых групп DMPC и CHAPS. Вертикальная пунктирная линия показывает положение сигнала от амидной группы CHAPS, которая наблюдается в спектрах ^{15}N-HSQC на натуральном содержании.

4.9.4. Влияние ободообразующего агента на структуру водорастворимых доменов белков.

Помимо процессов, происходящих в липидной мембране, важно, чтобы внемембранные домены также сохраняли свою функциональность в составе частиц мембраноподобных сред. Известно, что детергенты зачастую денатурируют водорастворимые белки, то же самое может случиться и с водорастворимыми доменами интегральных МБ в бицеллах. Именно по этой причине рассматривается применение детергентов типа Façade. В рамках данной работы

изучалось множество МБ, в том числе рецептор нейротрофинов p75, который, как оказалось, является удобным объектом для исследования влияния обода бицелл на структуру водорастворимых доменов МБ. Рецептор принадлежит к классу битопных МБ и содержит небольшой внутриклеточный глобулярный домен массой 10 кДа (домен смерти, death domain). В представленной работе проводилось исследование конструкции, содержащей ТМ домен и внутриклеточный домен рецептора (p75-ΔECD, остатки 236-427) в различных мембраноподобных средах. При этом, для сравнения имелись спектры ЯМР отдельного домена смерти (p75-ДС, остатки 280-427) белка в водном растворе при физиологических значениях pH и ионной силы. В первую очередь, были получены спектры ^{1}H,^{15}N-HSQC в мицеллах детергента (DPC), стандартных бицеллах (DMPC/DHPC q=0.33) и ЛБН DMPC/DMPG/MSP1D1 (Рис. 36).

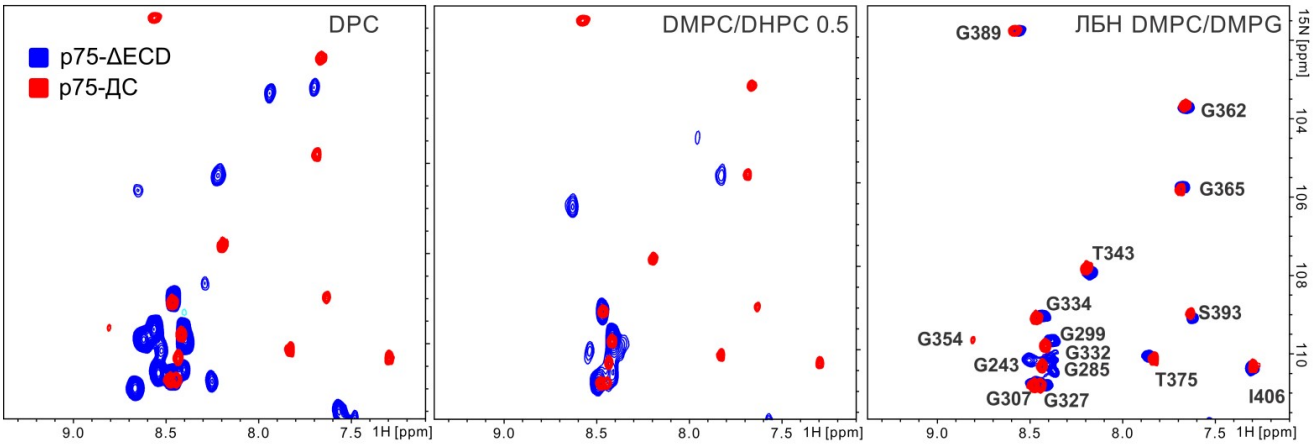

Рисунок 36. Фрагменты спектров ^{1}H,^{15}N-TROSY-HSQC, полученных для белков p75-ΔECD (показаны синим) в мицеллах DPC, бицеллах DMPC/DHPC q=0.5 и ЛБН DMPC/DMPG 4:1, а также и p75-ДС в водном буфере при 30 ºC. Отнесение сигналов показано на правой панели.

Как оказалось, нативная структура домена сохраняется только в ЛБН, что хорошо видно по спектру ДС, который полностью эквивалентен спектру домена в воде. При этом и DPC и DHPC приводят к значительным изменениям в спектрах ЯМР и, очевидно, к денатурации домена. Дальнейший анализ показал, что в бицеллах DMPC/CHAPS можно получить спектр, в котором кросс-пики находятся на тех же позициях, что и в спектрах p75-ДС в водном окружении. Однако, интенсивность сигналов от домена ослаблена по сравнению с интенсивностью сигналов от гибкого и неструктурированного линкерного участка, который соединяет ДС с ТМ частью белка. Более того, качество спектров сильно зависело от соотношения q. В чистом CHAPS виден исключительно линекрный участок между ТМД и ДС, при увеличении q начинают появляться кросс-пики ДС, их интенсивность растёт при увеличении q и понижении температуры (Рис. 37). Очевидно, ДС p75 взаимодействует с

CHAPS, что не приводит к изменению структуры домена, но вызывает его сорбцию на ободе бицелл или на поверхности мицелл CHAPS. При увеличении q растёт радиус бицелл, возможно меняются параметры упаковки CHAPS в ободе, уменьшается вероятность взаимодействия домена с ободом частицы, что приводит к появлению сигналов, соответствующих растворённому в воде ДС, который в данном случае постоянно переходит между растворённым и поверхностно-связанным состоянием. Неспособность CHAPS денатурировать ДС следует из полного совпадения химических сдвигов кросс-пиков в спектрах ЯМР p75-ΔECD и ДС. Взаимодействие белка с ободом, а не бислоем DMPC следует из спектров p75-ΔECD в ЛБН, интенсивности сигналов в которых соответствуют интенсивности сигналов от линкерного участка.

В данном случае ЛБН является приемлемой средой для проведения исследования, поскольку наблюдаются спектры ЯМР высокого качества, благодаря неструктурированному линкеру. Однако, ряд аспектов поведения белка можно изучить только в бицеллах/мицеллах. Так, например, p75 на поверхности клеток находится в состоянии ковалентного димера, причём дисульфидная связь образуется между ТМ доменами белка. Чтобы исследовать димеризацию, мембраноподобная среда должна разрешать обмен материи между частицами, что невозможно в ЛБН. DMPC/CHAPS в целом позволяют изучать структуру и подвижность конструкции p75-ΔECD, но, очевидно, теоретически возможно найти улучшенный вариант состава бицелл, в котором обод формировался бы ещё более мягкими детергентами, которые не будут сорбировать на себя ДС. С другой стороны, ЛБН имеют слишком большой размер, что не позволяет наблюдать сигналы от ТМД рецептора. Очевидно, что использование малых изотропных бицелл должно позволить преодолеть проблему.

В силу перечисленных причин было предложено рассмотреть бицеллы на основе детергентов Façade-EM и Façade-EPC - аналогов CHAPS с модифицированной полярной поверхностью, которая как раз и взаимодействует с растворимым доменом. Был приготовлен образец p75-ΔECD в липосомах DMPC, который затем разделили на три равные части, каждую из частей титровали растворами CHAPS, Façade-EM и Façade-EPC. Таким образом удалось получить три идентичных образца, отличающихся только ободообразующим агентом. Как показали первые эксперименты, несмотря на различия, во всех трех типах бицелл наблюдалась одинаковая интенсивность сигналов от линкерного участка, в частности от остатка G334. Чтобы провести корректное сравнение качества спектра ДС в различных средах, интенсивность нескольких сигналов от остатков ДС нормировалась на интенсивность кросс-пика от G334 в

спектрах TROSY. Полученная величина принималась за меру качества спектров, чем выше указанное отношение, тем выше качество.

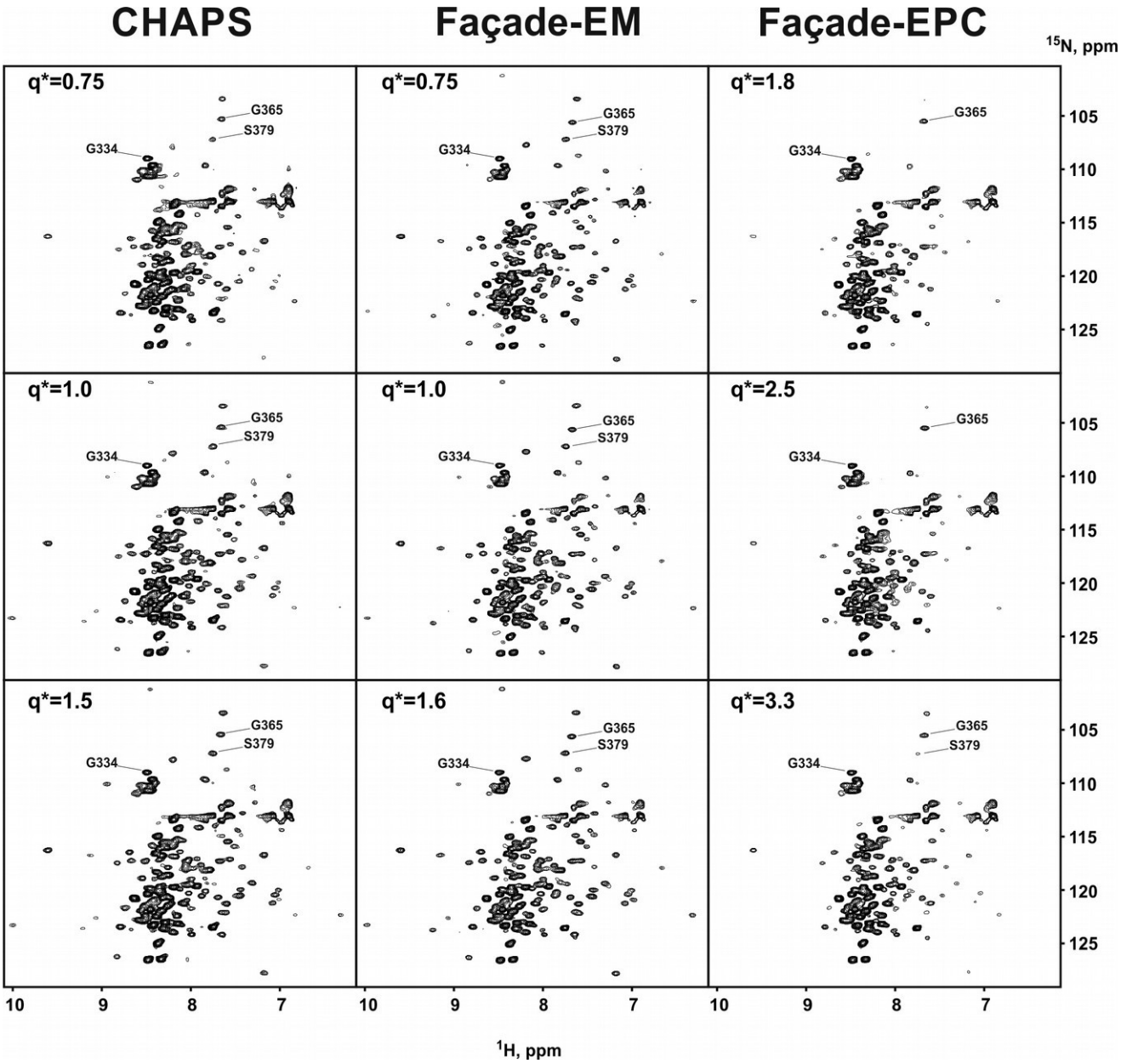

Рисунок 37. **С**пектры $^{1}H,^{15}N$-TROSY-HSQC, полученные для p75-ΔECD в бицеллах DMPC/CHAPS (слева), DMPC/Façade-EM (в центре) и DMPC/Façade-EPC (справа), приготовленных с различными отношениями q. Спектры регистрировались при 20 ºC.

Результаты эксперимента с Façade-EM показали, что данный детергент сохраняет нативно свернутое и растворимое состояние ДС p75 в широком диапазоне соотношений q. Даже при q=0.75 и 20 ºC спектры в DMPC/Façade-EM характеризовались более высоким качеством, чем любые спектры в бицеллах другого типа, а при q=1.6 и 20 ºC качество спектров было

сопоставимо с наблюдаемым в ЛБН (Рис. 38). При повышении температуры качество спектров падало, хотя для q>1 зависимость интенсивности сигналов от температуры была выражена достаточно слабо для большинства сигналов ДС. С другой стороны, применение Façade-EPC не приносит никакого выигрыша по сравнению с CHAPS, скорее наоборот. В случае Façade-EPC использовался немного другой диапазон q - 1.8-3.3, поскольку частицы на основе данного детергента формируются с меньшими радиусам. В результате, все спектры в указанном диапазоне соотношений DMPC/Façade-EPC оказались плохого качества, большинство сигналов было уширено, а многие отсутствовали. При температурах свыше 30 ºC наблюдалось появление дополнительного набора сигналов от ДС p75, что свидетельствует об изменении структуры домена. Следовательно, можно заключить, что Façade-EM является наиболее мягким ободообразующим агентом для изотропных бицелл, и позволяет получить водорастворимый домен модельного мембранного белка в свёрнутом виде, без сорбции на поверхности обода. При этом Façade-EPC и CHAPS взаимодействуют с доменом, что приводит к ухудшению спектра, а DHPC вызывает денатурацию белка.

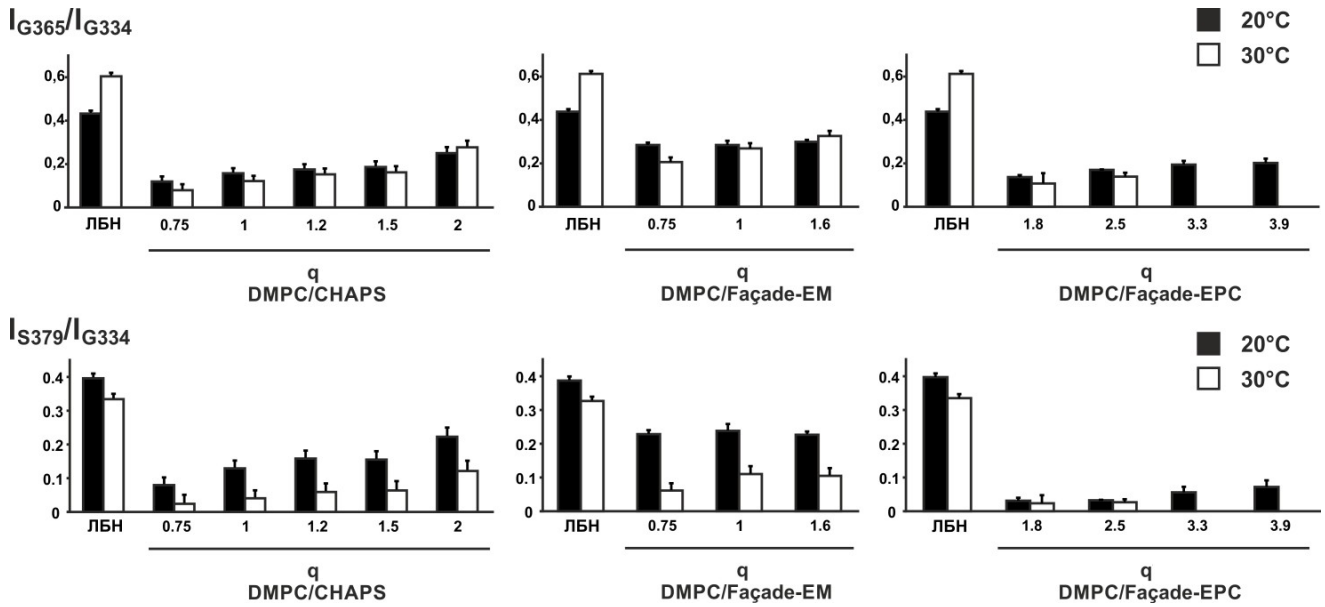

Рисунок 38. Качество спектров ЯМР ДС p75 в составе белка p75-ΔECD в различных типах бицелл на основе плоских амфифилов при 20 и 30 ºC. Как критерий качества выступает отношение интенсивностей сигналов от амидной группы G365 и S379 к интенсивности сигнала от остатка линкерного участка (G334).

4.10 Разработка методики детекции фазовых переходов в изотропных бицеллах

Разделы 4.1-4.9 отвечают на вопрос о форме частиц изотропных бицелл. В рамках данной части работы удалось предложить модели идеальной бицеллы и показать, что малые бицеллы некоторых составов следуют данным моделям при определённых условиях, при этом параметры частиц оказываются разумными, соответствуют предположениям, сделанным на основе структуры молекул липидов и детергентов. В то же время некоторые составы явно не формируют идеальных бицелл, наблюдается смешивание между липидами и детергентами, которое можно регистрировать. Использование ТМ домена в качестве сенсора позволяет показать, что в ближайшем окружении белка присутствуют именно фосфолипиды, а не детергенты. Таким образом, близкую к идеальной структуру бицелл на основе DHPC и CHAPS при определённых условиях окружающей среды можно считать практически доказанным фактом. Однако, остаётся вопрос, насколько хорошо частицы изотропных бицелл малого размера оказываются в состоянии воспроизводить свойства липидного бислоя. Одним из способов ответа на данный вопрос является изучение фазового поведения липидов в бицеллах. Липиды в бислойных мембранных претерпевают основной фазовый переход между гелевой (аналог твердой фазы) и жидкокристаллической фазами (аналог жидкого агрегатного состояния) [429]. В литературе также можно встретить описание других фаз липидного бислоя, например, жидко-упорядоченной фазы, наблюдаемой в микродоменах клеточной мембраны, такие фазы образуются за счёт кластеризации молекул различной структуры в смешанных липидных везикулах [430]. Критическая температура фазового перехода зависит от структуры ацильных цепей и головных групп. При одинаковом устройстве головных групп можно сформулировать две закономерности: (1) чем короче цепь липида, тем ниже температура фазового перехода; и (2) чем больше двойных связей содержится в цепи, тем ниже температура фазового перехода. Существуем много способов изучения фазовых переходов в липидных бислоях, наиболее прямым методом можно считать калориметрию. В случае бицелл, изучение фазовых переходов проводили при помощи ИК-спектроскопии и ^{31}P ЯМР (для анизотропных бицелл) [83,105,431]. При помощи ИК-спектров были изучены смеси DMPC/DHPC при трёх q: 0.5, 0.75 и 1.0, показано, что при q=1.0 наблюдается широкий фазовый переход, смещённый в более низкую температуру, а при q=0.5 фазового перехода в принципе не наблюдается, что позволяет авторам работы заключить, что в малых частицах отсутствует липидный бислой [105]. При помощи спектроскопии ^{31}P изучался фазовый переход другого рода - процесс спонтанной ориентации бицелл в магнитном поле [83,431]. Ниже фазового перехода наблюдается так называемый "изотропный сигнал" - пик в районе 0 м.д., соответствующий изотропному состоянию бицелл.

Выше критической точки изменяется положение сигнала (на 10-20 м.д.) и наблюдается уже "анизотропный пик", соответствующий возникновению спонтанной ориентации частиц. Также при помощи ^{31}P исследовали равновесие между DHPC в мономерной форме в растворе и детергентом в составе бицелл DMPC/DHPC [98]. Таким образом, химический сдвиг фосфора оказывается чрезвычайно чувствительным к состоянию головных групп липидов и можно ожидать, что спектроскопия ЯМР ^{31}P позволит регистрировать фазовые переходы в изотропных бицеллах, а также выявить смешивание между липидами и детергентами, в том случае, если указанные явления будут происходить в частицах при каких-либо внешних условиях.

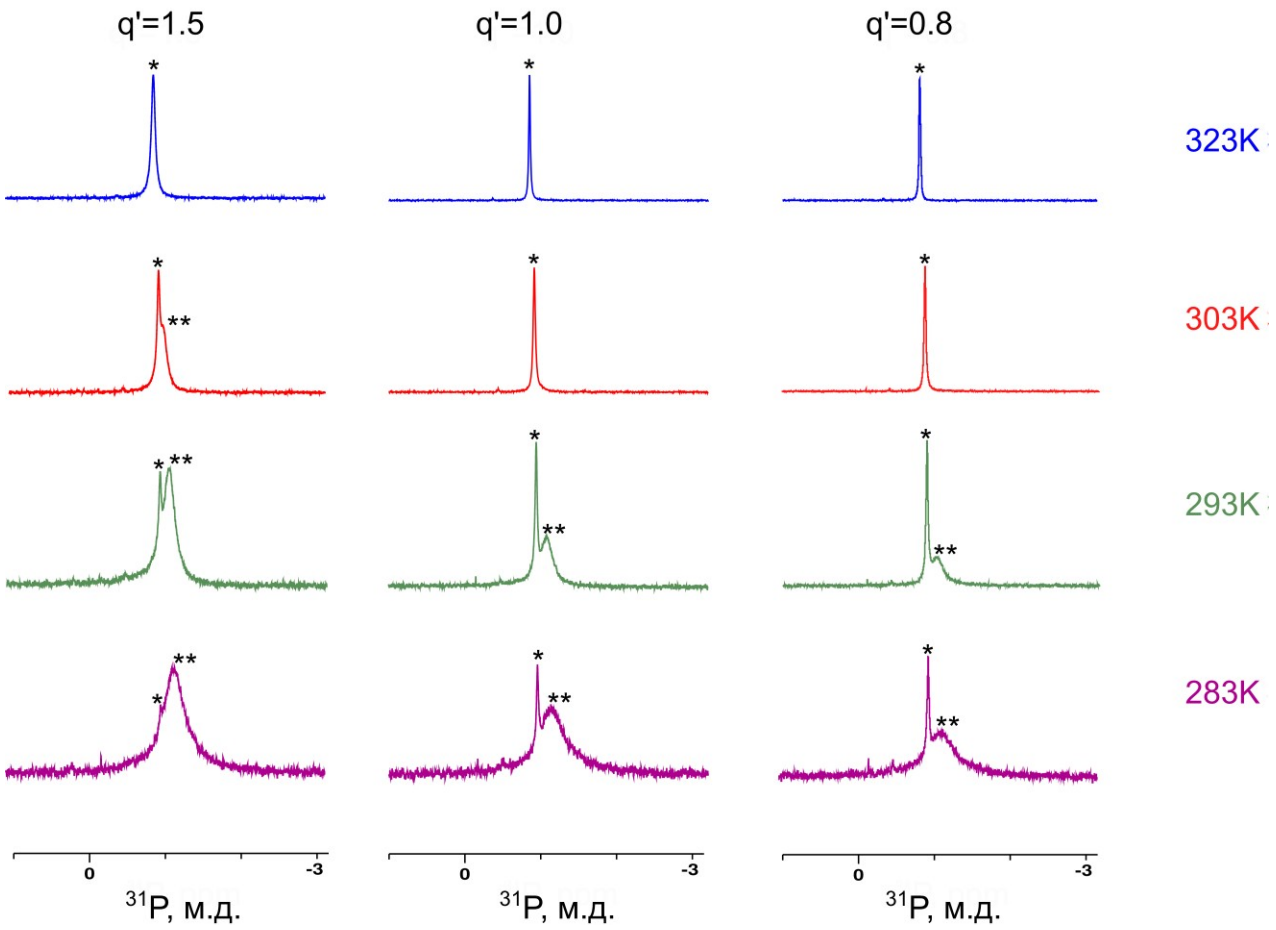

Рисунок 39. Фрагменты спектров ЯМР ^{31}P, содержащие сигналы от фосфатных групп липидов, полученных при температурах от 10 (283 K) до 50 (323 K) ºC для изотропных бицелл DPPC/CHAPS с q' равным 1.5, 1.0 и 0.8. Сигналы от ж.-к. и гелевого состояния липидов отмечены * и **, соответственно.

Поэтому, в рамках настоящей работы было предпринято систематической исследование бицелл различного состава, с использованием спектроскопии ЯМР ^{31}P. Первые эксперименты проводились в смеси DPPC/CHAPS по нескольким причинам. Во-первых, CHAPS является

более удобным детергентом, чем DHPC - он не содержит фосфатных групп, что упрощает вид спектров ЯМР, а также оказывается примерно в 4 раза дешевле, не подвержен гидролизу при высоких температурах и низких pH. Во-вторых DPPC является наиболее удобным липидом для изучения фазовых переходов. Критическая температура DPPC (41 ºC) позволяет получать спектры в диапазоне ±40 ºC от точки фазового перехода. Начальные эксперименты проводились при q'=1.5 - При данных условиях образуются частицы с радиусом 5.1 нм при 35 ºC, наблюдается температурно-зависимый рост частиц при нагреве выше 40 ºC. Бицеллы такого размера уже претерпевают фазовые переходы, согласно результатам исследований другими методами - размер частиц превышает радиус бицелл DMPC/DHPC q=1, для которых наличие перехода было показано методами ИК-спектроскопии [105].

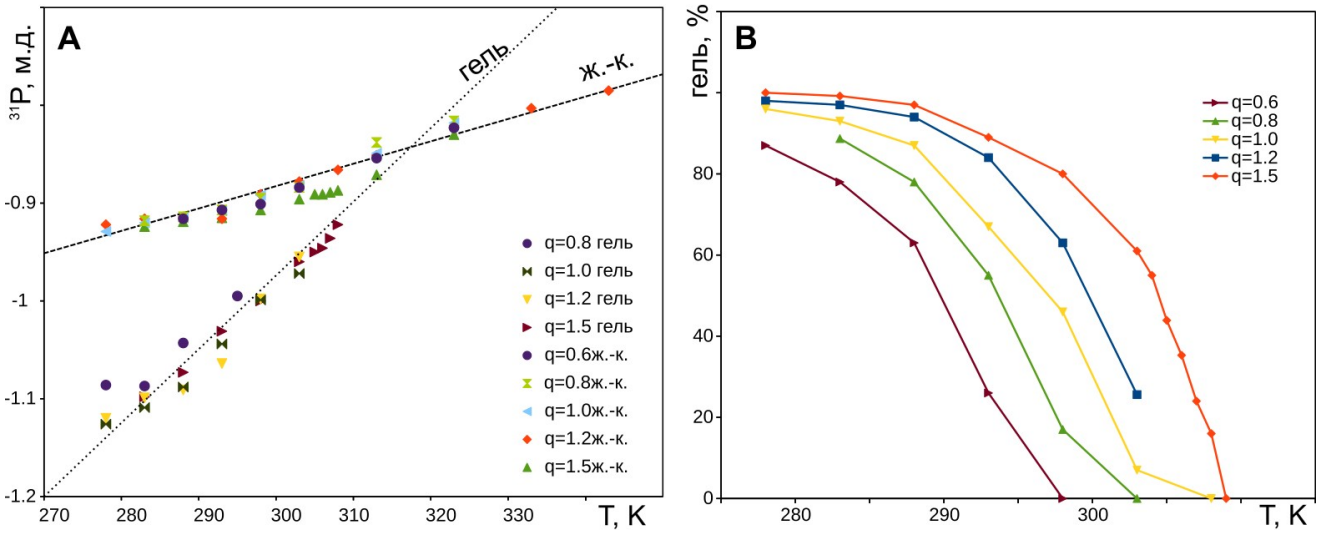

Рисунок 40. **A** - зависимость химического сдвига ^{31}P двух пиков DPPC бицелл DPPC/CHAPS, приготовленных с разными соотношениями q от температуры. Пунктирными линиями показан результат аппроксимации зависимостей прямыми. **B** - зависимость содержания липидов в гелевой фазе от температуры для бицелл DPPC/CHAPS, приготовленных с разными соотношениями q.

При высоких температурах в спектрах ^{31}P наблюдается единственный узкий пик при -0.8 м.д. (Рис. 39). При этом ниже 37 ºC, сигнал DPPC оказывается расщеплён на две компоненты, узкую и широкую, сдвинутую в область слабого поля. Заселённости двух компонент зависят от температуры - интенсивность широкого пика возрастает, а узкого - уменьшается при нагреве, до тех пор, пока в спектре не остаётся только один широкий пик при 10 ºC. Температурный коэффициент химического сдвига ^{31}P для узкого пика постоянен во всем изученном диапазоне температур (5-70 ºC) и равен 2.5 млрд.д./K. Температурный коэффициент широкого пика оказывается выше и составляет 8.5 млрд.д./K (рис. 40). Таким образом, полученные данные

позволяют сделать два основных вывода. Во-первых, при помощи ^{31}P-ЯМР можно наблюдать фазовые переходы в изотропных бицеллах, которые проявляются возникновением широкого пика, смещённого в область слабого поля, с повышенным температурным коэффициентом химического сдвига. Во-вторых, фазовый переход в изотропных бицеллах является "фракционным". При некоторых температурах, гелевая и жидко-кристаллическая фаза сосуществуют в растворе. Это можно интерпретировать двумя способами - либо липиды находятся в различных состояниях внутри одной бицеллы, или же часть бицелл содержат только липиды в жидкокристаллической фазе, а часть - только липиды в гелевой фазе. Эти две ситуации можно различить при измерении коэффициентов диффузии двух сигналов в спектрах ^{31}P.

В связи с этим были получены спектры ^{31}P DOSY бицелл DPPC/CHAPS q=1.5 при 25 ºC. и спады сигналов от липидов в ж.-к. и гелевой фазах были обработаны по отдельности с использованием одновременной деконволюции и аппроксимации псевдодвумерных спектров DOSY в разработанном специально для данных целей программном обеспечении в среде Wolfram Mathematica (Рис. 41).

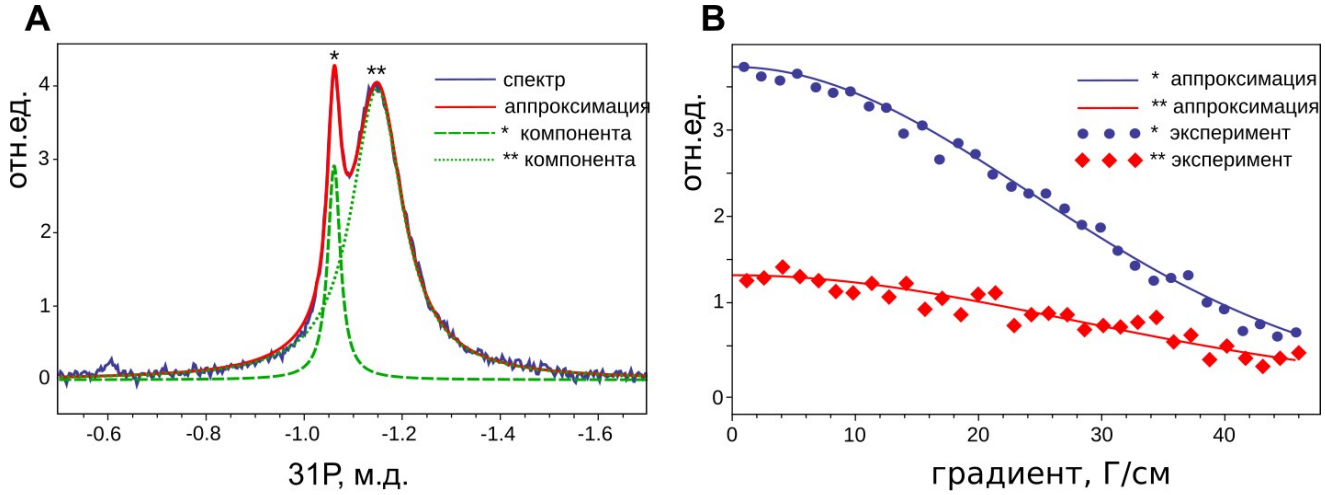

Рисунок 41. А - результат деконволюции сигнала от фосфатной группы фосфолипида в спектре ^{31}P ЯМР бицелл DPPC/CHAPS q=1.5 при 25 ºC. * и ** обозначают пики, соответствующие липидам в ж.-к. и гелевом агрегатном состоянии. Синим показаны экспериментальные значения, красным - результат аппроксимации сигнала двумя лоренцевыми линиями, зелёным пунктиром показаны формы линий для двух компонент сигнала. **В -** результат анализа спада в спектре DOSY бицелл DPPC/CHAPS q=1.5 при 25 ºC. Синими и красными точками показаны экспериментальные спады интенсивности, полученные на частотах соответствующих максимумам сигналов от форм * и **. Линиями показан результат аппроксимации двумя лоренцевыми линиями с разными коэффициентами диффузии.

Эксперимент выявил существенное различие радиусов частиц, соответствующих широкому и узкому пику, что однозначно доказывает, что фазы липидов не сосуществуют

внутри бицелл, а соответствуют разным частицам - гелевым и ж.-к. бицеллам. При этом, бицеллы в ж.-к. фазе характеризуются радиусом 4.00±0.08 нм, в то время как частицы в гелевой фазе оказываются гораздо больше и соответствуют радиусу 5.82±0.11 нм (Рис. 42). Это противоречит интуитивному представлению о фазовом переходе, в гелевой фазе упаковка липидов должна стать более плотной, чем в ж.-к. [426], при этом параметр λ в уравнении (8) должен возрасти, что приведёт к уменьшению бицелл, а не увеличению, как наблюдается в реальности. Можно предложить несколько вариантов объяснения увеличения бицелл в гелевой фазе. Во-первых, это может быть следствием изменения параметров смешивания/сегрегации молекул липидов и детергентов выше и ниже критической точки. Если бицеллы с гелевыми и ж.-к. липидами характеризуются различными морфологией и структурой, то это может привести к наличию двух типов частиц с различным уровнем смешивания между липидом и детергентом. Такое смешивание может объяснить и слегка пониженную температуру фазового перехода DPPC в бицеллах по сравнению с липидным бислоем. Однако, приведенное объяснение противоречит ряду наблюдаемых фактов. Во-первых, когда измеряется средний размер всего набора частиц при помощи диффузионной спектроскопии ^{1}H, радиус ж.-к. бицелл оказывается больше чем радиус гелевых. Так, при 40 ºC радиус бицелл q=1.5 DPPC/CHAPS равняется 6.9±0.2 нм, что существенно больше, чем 5.1±0.1 нм при 35 ºC (точка, когда начинается "фракционный" фазовый переход) и даже больше, чем радиус бицелл с гелевой фазой липидов при 25 ºC. Иными словами, "быть меньше, чем гелевые бицеллы" нельзя назвать свойством всех ж.-к. бицелл, это свойство проявляется только когда два типа частиц одновременно присутствуют в растворе. Следовательно, меньший размер ж.-к. бицелл при фракционном фазовом переходя нельзя объяснить изменением уровня смешивания между липидом и детергентом. Более того, смешивание должно увеличиваться с ростом температуры, в силу второго закона термодинамики (сегрегация липида и детергента - состояние с пониженной энтропией), а миграция детергента в бислойную область бицеллы (смешивание) должна приводить к увеличению бицелл, а не к их уменьшению, поскольку такая миграция эквивалентна увеличению эффективного соотношения q'.

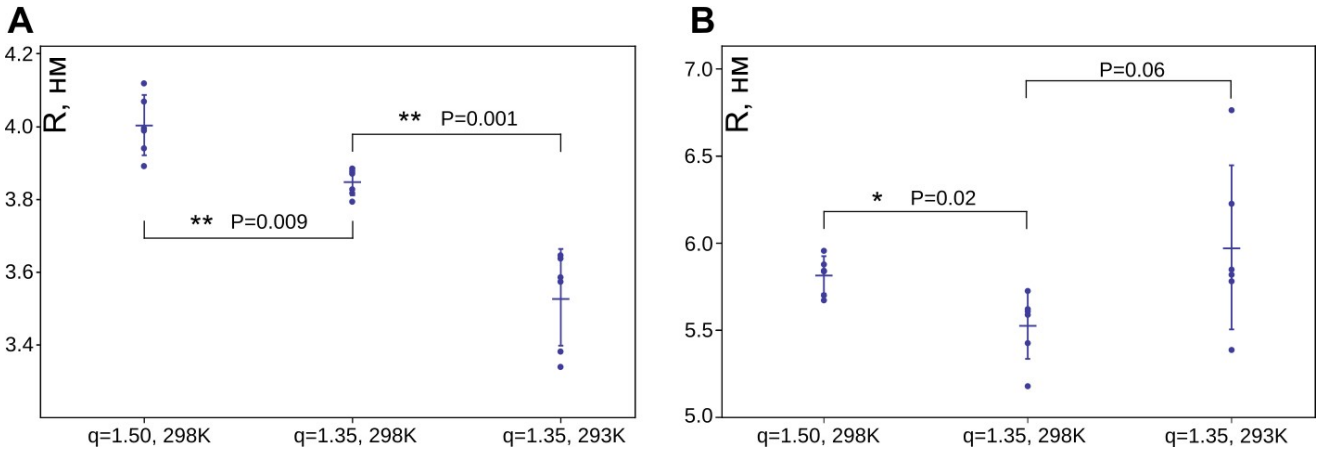

Рисунок 42. А - радиус ж.-к. бицелл DPPC/CHAPS q=1.50 и q=1.35 при 25 и 20 ºС. **В** - радиус гелевых бицелл DPPC/CHAPS q=1.50 и q=1.35 при 25 и 20 ºС. Показаны достоверность наблюдаемых изменений и p-значения.

Меньший размер ж.-к. бицелл ниже критической точки можно объяснить, предположив, что малые частицы характеризуются пониженной вероятностью претерпеть фазовый переход. Бицеллы не являются непрерывной средой, они представляют собой набор дискретных частиц, размер которых удовлетворяет некоему статистическому распределению. В свою очередь, детергенты сравнительно подвижны и могут нарушать упаковку соседствующих с ними липидов, препятствуя фазовому переходу. В малых бицеллах на молекулу липида приходится больше молекул детергента, что ещё сильнее нарушает упаковку липидов. С использованием модели идеальной бицеллы (8) можно оценить, что бицеллы радиусом 4 нм содержат 72 молекулы липида, из которых 22 (31%) граничит с ободом из детергента, в то время как бицеллы радиусом 5.5 нм содержат 178 молекул липида из которых всего 20% контактируют с ободом, что подразумевает лучше упакованный липидный бислой и более высокую температуру фазового перехода. При этом, фазовый переход внутри отдельной бицеллы - стохастический процесс, который характеризуется вероятностью, которая может зависеть от размера частицы. Следовательно, должно быть распределение бицелл с гелевой и ж.-к. фазами липидов внутри образца, что объясняет "фракционность" фазового перехода. При понижении температуры вероятность "замёрзнуть" возрастает и бицеллы все меньшего размера оказываются в гелевой фазе, что объясняет зависимость от температуры на рис. 36.

Дополнительно, можно предложить другое объяснение, основанное на разнице энергии CHAPS в ободе ж.-к. и гелевых бицелл. Уравнение (8) основано на том, что все бицеллы образуются с одинаковым эффективным q, однако, очевидно, что это не так, когда в растворе одновременно присутствуют два типа частиц с существенно разной упаковкой липидного

бислоя. В такой ситуации может образовываться две популяции частиц с различным q, при сохранении среднего соотношения липид/детергент в сумме для двух популяций. Так происходит, если энергия CHAPS в ободе бицелл зависит от фазы липидного бислоя. Если нахождение CHAPS в ободе бицелл с ж.-к. липидами существенно выгоднее, будет происходить перераспределение детергента между бицеллами, что будет приводить к меньшему q и меньшему размеру ж.-к. бицелл. Данное объяснение находит подтверждение в зависимости концентрации свободного детергента от температуры (Рис. 43). В бицеллах, которые не испытывают фазовых переходов (DMPC/CHAPS q=1), концентрация детергента в растворе почти постоянна (3.5 мМ) и слабо зависит от температуры. В случае бицелл DPPC/CHAPS q=1.35, концентрация CHAPS в мономерной форме ниже критической точки начинает возрастать с начальных 3.0 мМ до 7-8 мМ при 10 ºС, когда в растворе остаются только гелевые бицеллы. Увеличение концентрации детергента в растворе эквивалентно уменьшению разницы свободных энергий между состоянием детергента "в растворе" и "в ободе", что идеально согласуется с наблюдаемыми размерами гелевых и ж.-к. бицелл.

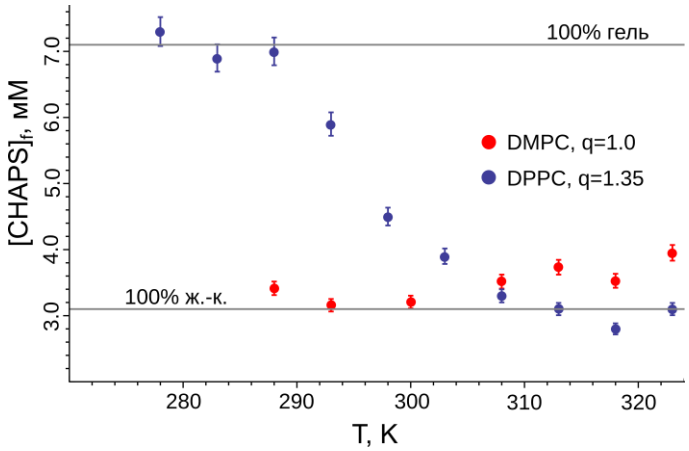

Рисунок 43. Зависимость концентрации CHAPS в мономерной форме в растворе от температуры, наблюдаемая для бицелл DMPC/CHAPS q=1.0 (все липиды в ж.-к. форме) и DPPC/CHAPS q*=1.35, фракционный фазовый переход начинается при 35 ºС и заканчивается при 10 ºС.

Предложенные гипотезы можно проверить, измерив зависимость радиусов двух популяций бицелл от температуры. Для бицелл q=1.5 доля ж.-к. бицелл оказывается слишком мала при 20 ºС, чтобы провести точные измерения, поэтому был приготовлен образец DPPC/DHPC q=1.35, для которого эксперименты по измерению диффузии ^{31}P были проведены при 20 и 25 ºС. Радиусы и ж.-к. и гелевых бицелл достоверно уменьшились при изменении q до 5.53±0.19 нм (p=0.02) и 3.85±0.04 нм (p=0.009) при 25 ºС (Рис. 42). При охлаждении до 20 ºС

радиус гелевых бицелл увеличился до 5.98±0.47 нм, однако низкая точность данных не позволяет сделать однозначный вывод о достоверности (p=0.063). При этом радиус ж.-к. бицелл достоверно уменьшился до 3.53±0.12 нм (p=0.0012). Таким образом, при понижении температуры радиус ж.-к. бицелл действительно понижается, что можно рассматривать как косвенное подтверждение выдвинутых гипотез.

Стоит отметить, что сосуществование в растворе бицелл с различным фазовым состоянием бислоя при температурах ниже критической точки имеет важные следствия. Во-первых изотропные бицеллы не следует применять для исследований структуры МБ ниже температуры фазового перехода используемого липида. Предпочтительнее иметь однородные образцы, в которых все молекулы белка будут в одном состоянии, а в случае, когда в растворе находятся два различных типа частиц, это невозможно. Во-вторых, изотропные бицеллы являются неудачной системой для изучения влияния фазовых переходов бислоя на поведение МБ, по тем же самым причинам.

Подытожив параграф 4.10, можно заключить, что в изотропных бицеллах происходят фазовые переходы липидного бислоя, при температурах, близких к критической температуре соответствующего липида в других модельных системах. Фазовые переходы происходят фракционно - частицы с гелевым и ж.-к. состоянием липидов сосуществуют в широком диапазоне температур. При этом, бицеллы с гелевыми липидами оказываются большего размера, в силу особенностей формирования обода и влияния содержания детергента в частице на температуру перехода.

4.11 Влияние состава бицелл на параметры фазовых переходов в изотропных бицеллах.

4.11.1. Влияние q'

Для того, чтобы понять, как выглядят малые изотропные бицеллы, которые применяются при исследованиях структуры МБ методами ЯМР-спектроскопии, необходимо более детально изучить зависимость параметров фазовых переходов липидов от размера частиц (соотношения q'). Для этой цели были приготовлены несколько образцов бицелл DPPC/CHAPS с q' в диапазоне 0.6-1.5, для каждого из образцов были получены спектры ^{31}P при температуре от 5 до 70 ºC. Данный эксперимент показал, что фазовые переходы происходят даже в самых малых бицеллах, например, в частицах q'=0.6 DPPC/CHAPS, радиус которых равен 2.7 нм, что эквивалентно бицеллам DMPC/DHPC q=0.3, наиболее широко распространённой мембраноподобной среде при исследованиях структуры МБ. Зависимость химических сдвигов ж.-к. и гелевых бицелл

практически одинаковы при всех изученных соотношениях q' (Рис. 40А). То есть, со стороны головных групп не наблюдается существенных различий между большими и малыми частицами, упаковка липидов в них практически одинакова. С другой стороны, некоторые свойства фазовых переходов разнятся в больших и маленьких частицах. В частности, доля частиц с гелевым состоянием липидов уменьшается с соотношением q' (Рис. 40В). Можно определить эффективную температуру фазового перехода (T_e) как точку, в которой половина частиц находится в гелевой форме, тогда T_e снижается от 32.5 ºС при q'=1.5 до 17 ºС при q'=0.6. Это согласуется с высказанной выше гипотезой, что малые частицы с меньшей вероятностью переходят в гелевую форму, чем большие. Регистрация фазовых переходов в малых частицах разрешает длительный спор о морфологии изотропных бицелл. Становится очевидно, что участок липидного бислоя присутствует даже в самых мелких частицах, которые способны воспроизводить одно из основных свойств липидных мембран - фазовые переходы из гелевого состояния в ж.-к.

4.11.2. Влияние структуры липидов.

До настоящего момента представлены данные о единственной системе - DPPC/CHAPS. Однако, общий характер сделанных выводов и применимость подхода необходимо проверить на бицеллах, содержащих другие липиды и ободообразующие ПАВ. По этой причине было принято решение изучить влияние свойств ацильных цепей липидов на фазовые переходы. Были приготовлены несколько образцов бицелл DMPC/CHAPS и POPC/CHAPS, для которых осуществлялась регистрация спектров ^{31}P (Рис. 44). Бицеллы q'=1.2 POPC/CHAPS вели себя как и ожидалось: в спектрах наблюдался единственный сигнал при всех опробованных температурах с температурным коэффициентом 3.5 млрд.д./К и химическим сдвигом, близким к сдвигу DPPC в бицеллах в ж.-к. форме. Иными словами, фазовый переход не наблюдается в бицеллах POPC/CHAPS, что предсказуемо, поскольку POPC характеризуется критической температурой ниже 0 ºС.

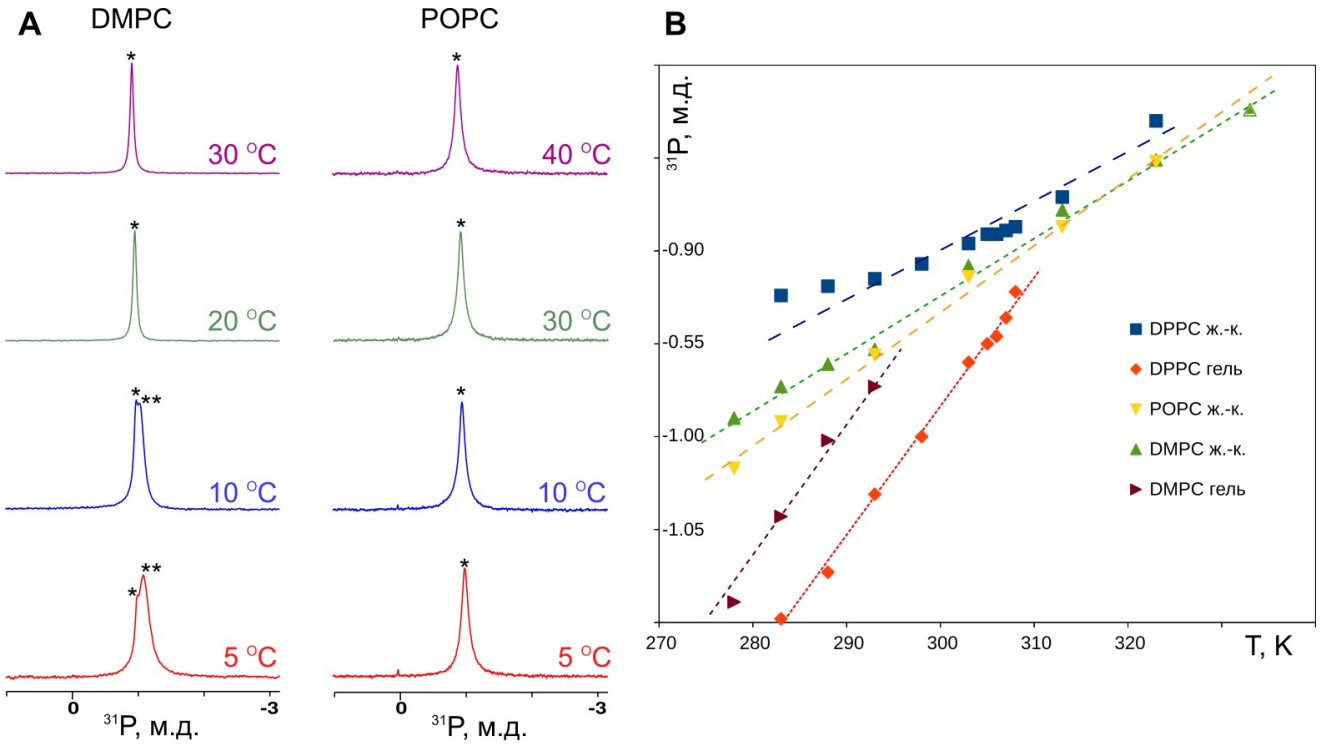

Рисунок 44. А - спектры ^{31}P, полученные для бицелл q'=1.5 DMPC/CHAPS и q'=1.2 POPC/CHAPS приведены при нескольких температурах. Пики, соответствующие ж.-к. и гелевым частицам помечены * и **, соответственно. **В** - зависимость химического сдвига ^{31}P сигналов ЯМР от ж.-к. и гелевых бицелл q'=1.5 DPPC/CHAPS, q'=1.5 DMPC/CHAPS и q'=1.2 POPC/CHAPS от темпеартуры. Пунктирными прямыми показан результат аппроксимации наблюдаемых точек линейными зависимостями.

DMPC, наоборот, вёл себя аналогично DPPC в бицеллах на основе CHAPS: два сигнала ^{31}P, узкий и широкий, наблюдались в спектрах ЯМР ниже 20 ºC при q'=1.5, в то время как критическая температура DMPC равна 24 ºC в бислое (Рис. 44,45). Широкий пик сдвинут в область слабого поля и характеризуется большим температурным коэффициентом, 8 млрд.д./K. Как и для DPPC, эффективная критическая температура фазовых переходов снижается при малых q': с 17 ºC при q'=1.5 до 8 ºC при q=1. Таким образом, можно заключить, что свойства спектров ^{31}P одинаковы для всех фосфатидилхолиновых липидов в бицеллах и чётко отражают наличие фазовых переходов. Что особенно важно, взаимоотношение между критической температурой перехода и структурой липидов в бислоях воспроизводится в бицеллах (например, липиды с более короткими цепями и липиды с ненасыщенными жирными кислотами изменяют фазовое состояние при пониженной температуре). Это позволяет считать изотропные бицеллы адекватным миметиком липидной мембраны.

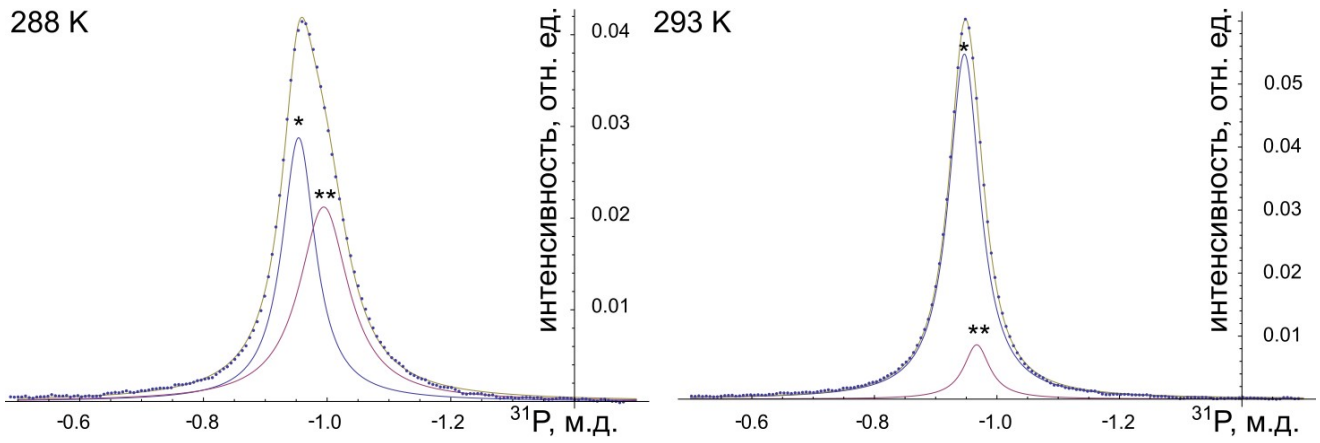

Рисунок 45. Результат деконволюции спектра ЯМР ^{31}P бицелл q'=1.5 DMPC/CHAPS при 15 и 20 ºC. * и ** обозначают положение сигналов от ж.-к. и гелевых бицелл, соответственно.

4.11.3. Влияние ободообразующего детергента

Другим важным вопросом является изучение влияния обода бицелл на параметры фазовых переходов. В данном случае, вместо DPPC изучались спектры бицелл на основе DMPC, поскольку именно для этого липида ранее были исследованы размеры бицелл в зависимости от q и температуры для семи различных детергентов в ободе частиц. Для измерения параметров фазовых переходов были выбраны 4 детергента помимо CHAPS - Façade-EM, Façade-EPC, DHPC и DH_7PC. CHAPSO был исключён из рассмотрения, из-за того, что бицеллы на его основе чрезвычайно схожи с бицеллами CHAPS, а холиевая кислота не изучалась из-за очевидно неправильного характера сборки бицелл на основе данного детергента. В ряду детергентов особняком стоит DH_7PC, поскольку для него было однозначно показано неправильное формирование бицелл при температурах выше критической точки. Наиболее тщательно были изучены бицеллы на основе DHPC, поскольку DMPC/DHPC - наиболее широко применяемая в настоящий момент система. В случае DHPC поведение смесей было схожим с бицеллами DMPC/CHAPS и DPPC/CHAPS. В спектрах ^{31}P наблюдаются два сигнала выше точки фазового перехода - сигналы от липида и детергента в ж.-к. состоянии, при этом ниже точки фазового перехода появляется дополнительный широкий сигнал от липидов, смещённый в слабое поле - гелевые бицеллы (Рис. 46).

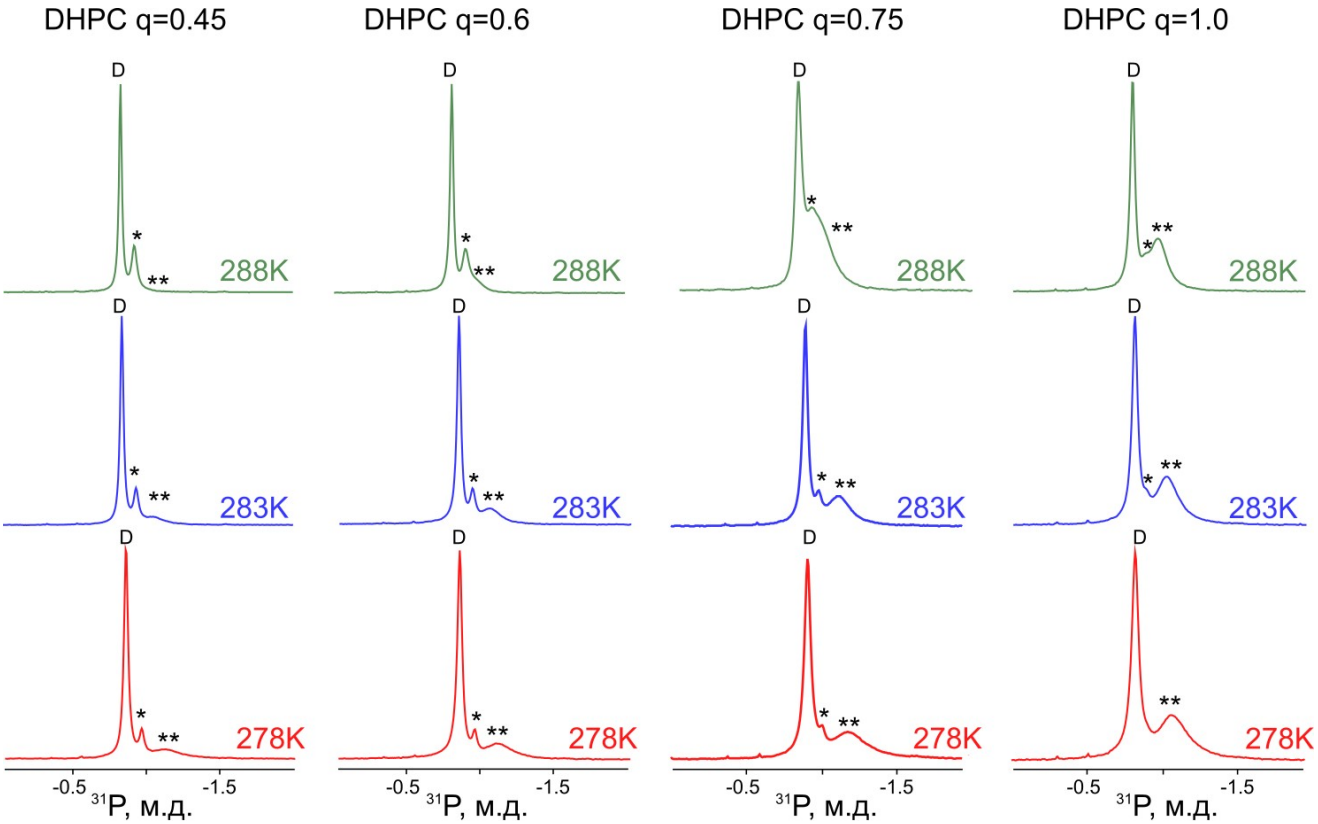

Рисунок 46. Спектры ^{31}P ЯМР бицелл DMPC/DHPC с различным соотношением q, в зависимости от температуры. D обозначает положение пика от фосфатной группы DHPC, * и ** обозначают положение от пика фосфатной группы DMPC в ж.-к. и гелевой форме, соответственно.

Эффективная температура фазового перехода Te, также зависит от соотношения q - при низких q Te снижается, при q=0.2 фазовый переход не наблюдается, в то время как, при q=1 практически весь липид находится в гелевом состоянии уже при 15 ^{o}C (Рис. 47).

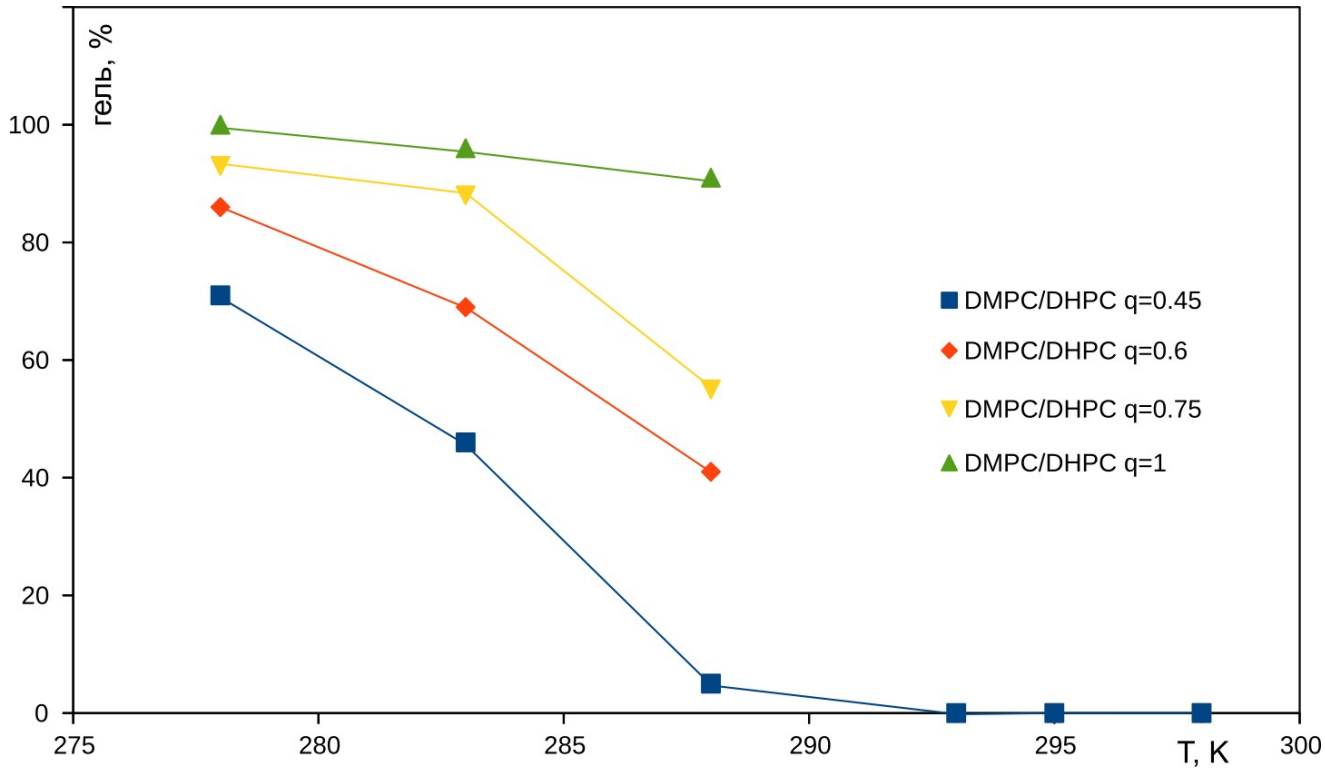

Рисунок 47. Доля DMPC в гелевом состоянии в бицеллах DMPC/DHPC, приготовленных с различным соотношением q, в зависимости от температуры.

Аналогичная ситуация наблюдается и в случае бицелл на основе Façade-EM и Façade-EPC (Рис. 48A). Интересно, что фазовые переходы обнаружены даже в самых малых частицах, применяемых в ЯМР-спектроскопии высокого разрешения - DMPC/DHPC q=0.45 (R=3.0 нм), DMPC/CHAPS q=1.0 (3.1 нм), DMPC/Façade-EPC q=1.1 (2.9 нм). Во всех случаях, зависимость химического сдвига ^{31}P от температуры была схожей, пик от ж.-к. DMPC характеризовался низким температурным коэффициентом, в то время как пик от гелевых липидов - высоким (Рис. 48B). Таким образом, можно заключить, что методика детекции фазовых переходов является универсальной и работает не только в случае липидов с разными ацильными цепями, но и в случае различных ободообразующих агентов. При этом параметры упаковки липидов в различных бицеллах схожи и определяются в первую очередь структурой фосфолипида, формирующего участок липидного бислоя.

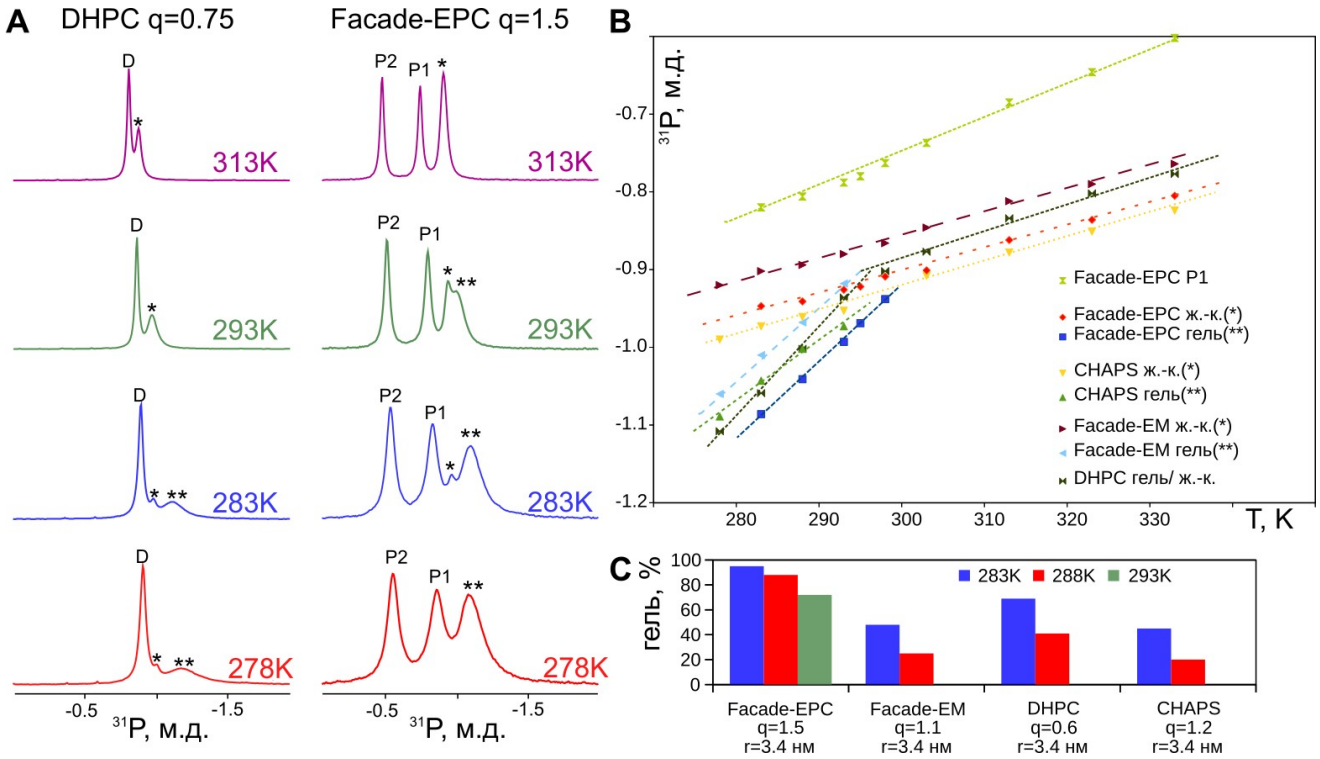

Рисунок 48. A - спектры ^{31}P бицелл DMPC/DHPC q=0.75 и DMPC/Façade-EPC q=1.5, полученные при различных температурах. D обозначает положение пика от DHPC, P1 и P2 - положения пиков фосфатных групп Façade-EPC, а * и ** - положения сигналов от ж.-к. и гелевой формы DMPC. **B -** зависимость химических сдвигов ^{31}P DMPC и P1 Façade-EPC от температуры в бицеллах DMPC/CHAPS q= 1.5, DMPC/Façade-EPC q=1.5, DMPC/Façade-EM q=1.5 и DMPC/DHPC q=1.0. Пунктирными прямыми показаны результаты аппроксимации экспериментальных данных линейными зависимостями. **C** - содержание DMPC в гелевом состоянии в бицеллах DMPC/CHAPS q= 1.2, DMPC/Façade-EPC q=1.5, DMPC/Façade-EM q=1.1 и DMPC/DHPC q=0.6 при различных температурах.

Однако, между четырьмя изученными типами бицелл наблюдается одно существенное различие. Если сравнить содержание липида в гелевой фазе в бицеллах на основе различных детергентов, имеющих один и тот же размер (3.4 нм), можно увидеть, что ободообразующие агенты влияют на эффективную критическую температуру (Te). Наилучшие результаты демонстрируют Façade-EPC и DHPC - детергенты, которые характеризуются меньшей амплитудой температурно-зависимого роста частиц. Более того, Façade-EPC сохраняет несоизмеримо больше липидов в гелевом состоянии, для данного детергента Te оказывается не ниже критической температуры DMPC в бислое - уже при 20 ºC большая часть DMPC оказывается в гелевом состоянии.

Отдельно отметим поведение бицелл на основе DH_7PC. Ранее было показано (Рис. 27), что бицеллы, образованные данным детергентом, испытывают сильнейший температурно-

зависимый рост и не следуют модели идеальной бицеллы при 20 и 40 ºС. Анализ спектров ^{31}P смесей DMPC/DH$_7$PC показывают, что частицы способны претерпевать фазовый переход, который, однако, происходит при температуре, ниже, чем для бицелл DMPC/DHPC с таким же q (Рис. 49). Более того, при температурах выше 20 ºС пики от липида и детергента уширяются и сливаются друг с другом, что может свидетельствовать о смешивании липидов и детергентов, согласуясь с пониженной температурой фазового перехода. Таким образом в смеси DMPC/DH$_7$PC образуются бицеллы при температуре ниже 10 ºС, в то время как при комнатной температуре и выше образуются большие частицы неизвестной формы с усиленным смешиванием между липидами и детергентами, что делает такие смеси неприменимыми для структурных исследований МБ. Данный пример показывает, что наличие фазовых переходов не является достаточным критерием корректности формирования бицелл. Для того, чтобы судить о структуре частиц, необходимо изучать два параметра смесей - зависимость R(q) и фазовые переходы.

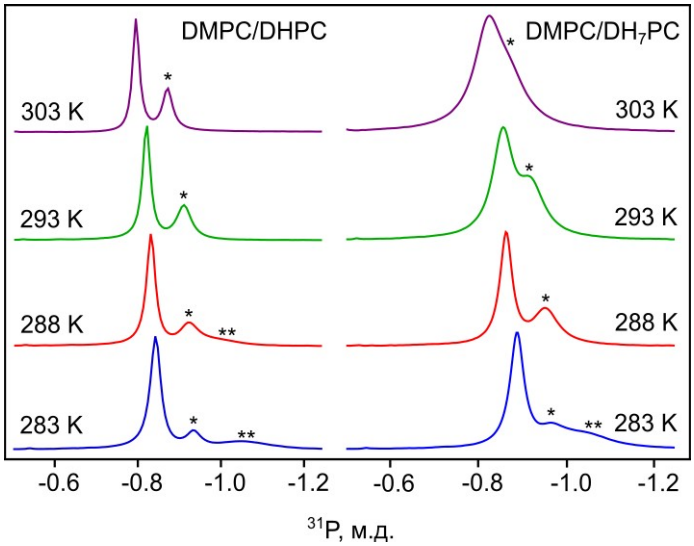

Рисунок 49. Спектры ^{31}P бицелл DMPC/DHPC и DMPC/DH$_7$PC при различных температурах. соотношение липид/детергент в обоих случая равнялось 0.6. Пики от DMPC в ж.-к. и гелевом состояниях отмечены * и **, соответственно.

Еще один важный вопрос - влияние температуры и q на сигналы от детергентов (DHPC и Façade-EPC) в спектрах ^{31}P. Полученные данные показывают, что поведение пиков от детергентов существенно отличаются от поведения пиков липидов. Так, для детергентов не наблюдается никакого эффекта от фазового перехода липидов, температурный коэффициент сигнала постоянен и близок к найденному в случае ж.-к. DMPC, сигналы оказываются узкими, имеют правильную форму, не видно двух состояний детергента. Даже при понижении

температуры до 5 ºС, когда пики от липидов оказываются чрезвычайно широкими в гелевой фазе, пик от детергента остаётся узким, то есть липиды и детергенты находятся в разном фазовом состоянии и сегрегированы. Все это свидетельствует в пользу отсутствия значимого уровня смешивания между липидами и детергентами в бицеллах на основе DHPC и Façade-EPC. В противном случае, если бы была фракция детергента, находящаяся преимущественно в окружении липидов, для детергента наблюдалось бы два состояния и два пика в спектрах ЯМР. В случае равномерного смешивания или быстрых переходов молекул детергента из планарной области частицы в обод и обратно должно наблюдаться уширение сигналов, как на рис. 49 для DH_7PC.

4.11.4. Большие бицеллы и ЛБН

Белок MSP можно также рассматривать в качестве ободообразующего агента, а ЛБН можно считать аналогом бицелл. Поэтому, интересно изучить, можно ли детектировать фазовые переходы в ЛБН при помощи спектров ^{31}P, как в бицеллах, и насколько отличаются параметры спектров из-за отсутствия детергентов. В нанодисках фазовые переходы были обнаружены при помощи малоуглового рассеяние рентгеновских лучей - частицы меняли размер на 10-15% при температуре, близкой к критической температуре липидов [116]. Поэтому, ЛБН можно рассматривать в качестве положительного контроля. Для проведения работы были приготовлены ЛБН DMPC/MSP1D1 и получена серия спектров ^{31}P при температурах 5-70 ºС. В ЛБН не наблюдались фракционные фазовые переходы - во всем диапазоне температур в спектре присутствовал один пик (Рис. 50). При этом на кривой зависимости химического сдвига ^{31}P от температуры наблюдался излом в районе 25 ºС. Выше 25 ºС сигнал ЛБН ведет себя так же, как и сигнал от ж.-к. бицелл, в то время как ниже 25 ºС увеличивается температурный коэффициент, поведение пика становится похожим на поведение гелевых бицелл. Таким образом, зарегистрировать фазовый переход можно даже в том случае, когда в спектре наблюдается только один сигнал от фосфатных групп липидов, по характеру зависимости положения пика от температуры. Отсутствие фракционного перехода в ЛБН оказывается ожидаемым, поскольку распределение ЛБН по размеру достаточно узкое и все частицы претерпевают фазовый переход при одной и той же температуре.

Интересно сравнить ЛБН с бицеллами схожего размера, для чего были приготовлены смеси DMPC/DHPC q=1 (5.1 нм), DMPC/Façade-EPC q=3 (4.9 нм) и DMPC/Façade-EM q=3 (5.7 нм). Оказалось, что спектры ЛБН идеально совпадают со спектром DMPC в составе бицелл DMPC/Façade-EPC q=3 и по положению сигнала и по его ширине. При этом сигналы в спектрах других бицелл смещены в сильное поле в ж.-к. состоянии и оказываются близки при низких

температурах. Более того, для всех перечисленных смесей не наблюдается фракционного характера фазового перехода, все частицы находятся в одном и том же состоянии. Вероятно, частицы при указанных соотношениях q оказываются слишком большого размера, и, даже несмотря на полидисперсность раствора, самые малые частицы уже не могут быть в ж.-к. состоянии при температурах ниже точки фазового перехода.

Таким образом, можно заключить, что с точки зрения головных групп, упаковка липидов одинакова в ЛБН и больших бицеллах, а в больших бицеллах свойства липидов схожи с таковыми в малых. Если рассматривать ЛБН в качестве "стандарта" мембраноподобной среды, содержащей фрагмент липидного бислоя, можно сказать, что бицеллы данному стандарту удовлетворяют в полной мере.

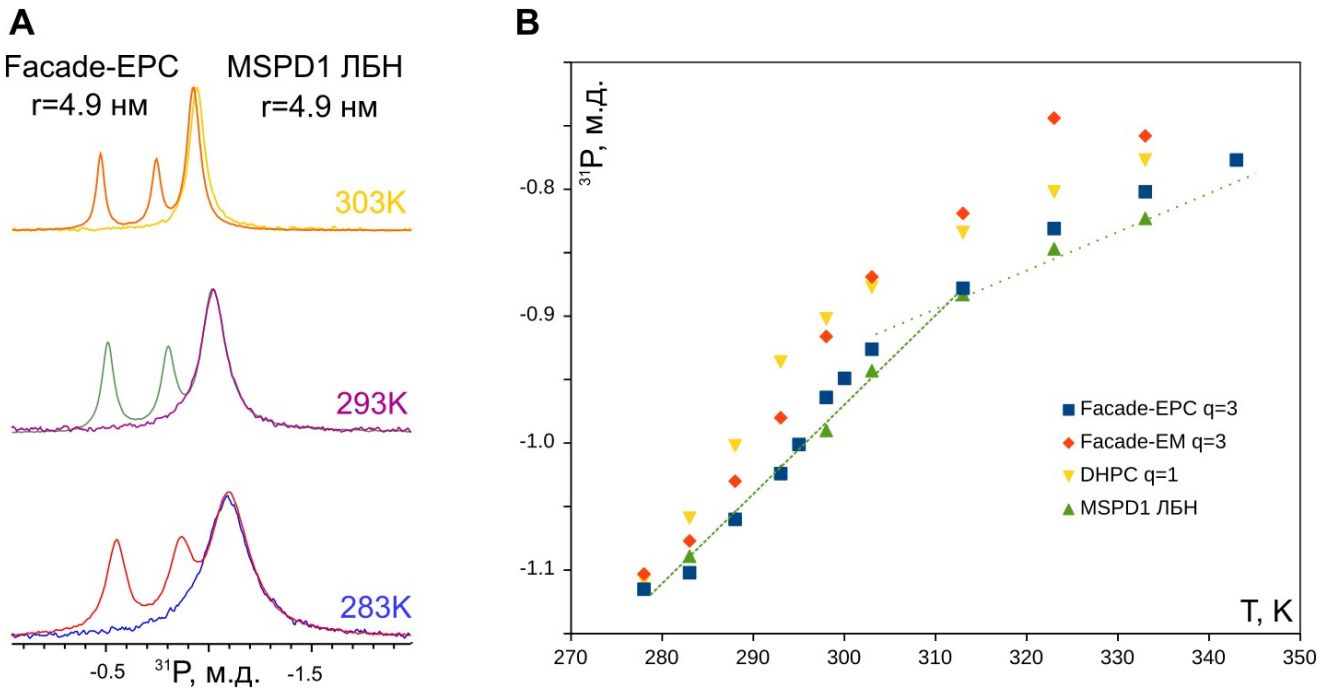

Рисунок 50. A - Суперпозиция спектров ^{31}P бицелл DMPC/Façade-EPC q=3 и ЛБН DMPC/MSP1D1 при различных температурах. **B -** зависимости химического сдвига ^{31}P от температуры приведены для больших бицелл на основе DHPC, Façade-EPC и Façade-EM, а также для ЛБН. Пунктирными прямыми показаны результаты линейной аппроксимации зависимости химического сдвига от температуры выше и ниже точки фазового перехода DMPC.

4.11.5 Зависимость от концентрации

Другим важнейшим параметром растворов бицелл является общая концентрация липидов. Для анизотропных бицелл были проведены исследования, которые показали, что концентрация может влиять на фазовое состояние системы и вызывать переходы между такими фазами как гексагональная, ламеллярная, изотропная и анизотропная [83]. Для оценки влияния

концентрации на параметры изотропных бицелл были проведены эксперименты по разбавлению бицелл DMPC/CHAPS и DPPC/CHAPS раствором, содержащим CHAPS в концентрации, равной $[Det]_{free}$ для q=1.5.

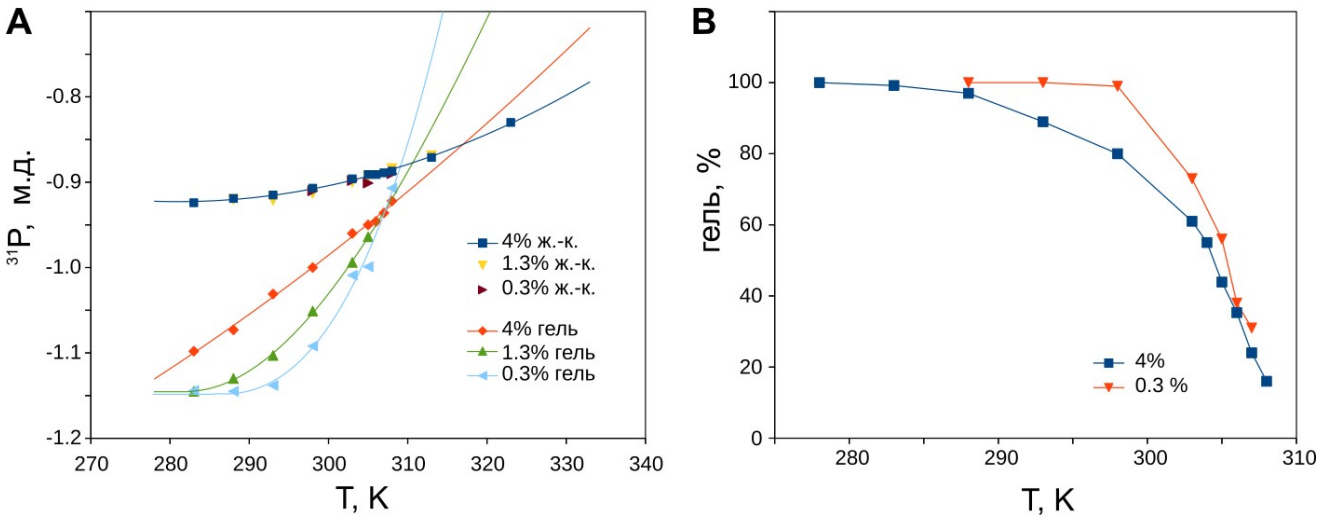

Рисунок 51. А - зависимость химического сдвига ^{31}P DMPC в ж.-к. и гелевом состоянии в бицеллах DMPC/CHAPS q=1.5 от температуры при концентрации бицелл 0.3 %, 1.3 % и 4% по массе. Линиями показана аппроксимация точек полиномом третьей степени. **В** - доля DMPC в гелевом состоянии в бицеллах DMPC/CHAPS q=1.5 при концентрации 4 % (синие точки) и 0.3 % (красные точки).

Изучалась зависимость параметров фазовых переходов и радиусов частиц от температуры. Концентрация частиц не влияет на размер бицелл DPPC/CHAPS q=1.5 при 35 ºC, однако 12-кратное разбавление с начальной концентрации 4 % до 0.3 % по массе привело к тому, что фазовый переход стал гораздо уже, при 27 ºC практически не осталось бицелл в ж.-к. состоянии. При этом, зависимость химического сдвига ^{31}P от температуры становится менее пологой и наблюдается плато химического сдвига: ниже 20 ºC сигнал фиксируется на -1.15 м.д., в то время как параметры спектра ж.-к. частиц на зависят от концентрации (Рис. 51). Стоит отметить, что в концентрированных образцах сигнал ^{31}P никогда не достигал этого значения. По всей видимости -1.15 м.д. соответствует гелевой фазе липидов, а в концентрированных образцах липиды постепенно переходят в гелевую фазу, образуя промежуточные состояния, что выражается в постепенном изменении химического сдвига с температурой. В качестве причины наблюдаемой зависимости свойств фазовых переходов от концентрации можно предложить соударения между частицами. При соударениях может нарушаться упаковка липидов в гелевой фазе, из-за чего часть частиц оказывается в ж.-к. состоянии, а часть - в промежуточном гелевом состоянии. Зависимость параметров фазовых переходов от концентрации объясняет некоторые

противоречия в литературе. Так, в работе Beaugrand с соавторами было показано, что в бицеллах DMPC/DHPC q=0.5 фазовые переходы не наблюдаются, в то время как в представленной работе отчётливо регистрируются фазовые переходы в системе DMPC/DHPC q=0.45 [105]. В указанном исследовании измерения проводились при концентрации бицелл 25%, в то время как здесь измерения велись в концентрации 3-5%, что и объясняет разночтение.

Как оказалось, концентрация бицелл влияет не только на фазовые переходы, но и на температурно-зависимый рост частиц. Так, постепенное разбавление начального раствора DMPC/CHAPS q=1.5 (10% по массе) раствором 2.5 мМ CHAPS, выявило уменьшение амплитуды эффекта ТЗР. Радиус бицелл при 40 ºС уменьшается с 8 нм при 60 мМ DMPC до 4.34 нм при 1.3 мМ (рис. 52). В то же время, при 15 ºС радиус бицелл не меняется и равен 3.7 нм. Таким образом, 32-кратное разбавление понижает амплитуду ТЗР со 116 до 19 %. Это подразумевает, что ТЗР также зависит от частоты соударений между частицами. Полученные данные о фазовых переходах и амплитуде ТЗР в различных составах бицелл позволяют понять природу данного явления, что и будет обсуждаться в следующем разделе.

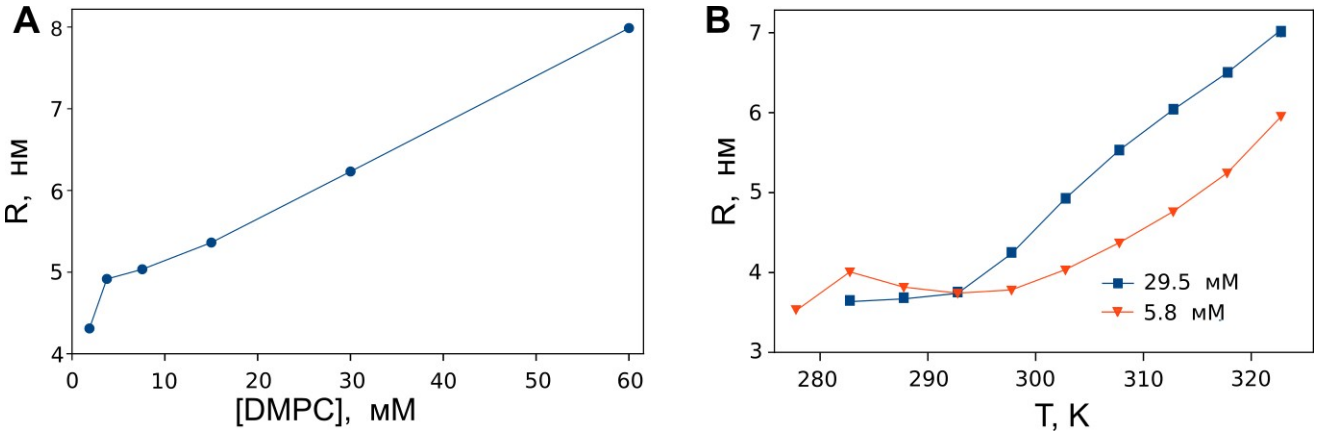

Рисунок 52. A - зависимость радиуса бицелл DMPC/CHAPS q'=1.5 при 40 ºС от концентрации липида. **B** - зависимость радиуса бицелл DMPC/CHAPS q'=1.5 от температуры при концентрации DMPC 29.5 мМ (синие точки) и 5.8 мМ (красные точки).

4.12. Причины возникновения температурно-зависимого роста бицелл

Разделы 4.1-4.12 содержат достаточное количество данных, чтобы можно было ответить на основной вопрос, связанный с изотропными бицеллами, - вопрос о форме и структуре частиц в растворе. Вся совокупность данных показывает, что большинство изученных составов образуют частицы, содержащие участок липидного бислоя, который может претерпевать

фазовые переходы между ж.-к. и гелевым состояниями. При температурах, близких к критическим точкам перехода липидов, зависимость R(q) для ряда составов удовлетворяет модели идеальной бицеллы (выражения (7) и (8)). Однако, во многих случаях наблюдается температурно-зависимый рост - размер бицелл при температурах выше точки фазового перехода может оказаться больше предсказанного моделью. Это означает, что образуются частицы, форма которых отличается от дисковидной или же происходит смешивание между липидами и детергентами в "бислойной" области бицелл. Стоит отметить, что малые бицеллы с $q<1$ в случае CHAPS и $q<0.7$ в случае DHPC всегда образуются в соответствии с идеальной моделью, так что не возникает сомнений в их применимости для структурных исследований. Однако, большие бицеллы, которые подвержены ТЗР могут характеризоваться изменённой формой и их применимость вызывает сомнения.

Чтобы разобраться, чем вызван феномен ТЗР бицелл, следует подытожить весь объем экспериментальных данных полученных на настоящий момент:

1. ТЗР возникает только в частицах радиусом свыше 3 нм, меньшие частицы не меняют свой размер при нагреве/охлаждении.

2. Эффект зависит от липидного состава бицелл и наиболее выражен в частицах с липидами с пониженной температурой фазового перехода (DLPC, POPC) и наименее выражен в DPPC.

3. ТЗР зависит от детергента в ободе, наименее выражен в бицеллах на основе DHPC и Façade-EPC, сильнее всего заметен в бицеллах на основе CHAPS и DH_7PC. Детергенты, в которых наблюдается наименьшая амплитуда ТЗР, демонстрируют наиболее узкий фазовый переход с наиболее высокой температурой.

4. ТЗР зависит от концентрации частиц и практически не наблюдается при высоком разбавлении.

5. За исключением DH_7PC, спектры ^{31}P частиц, которые подвержены ТЗР не отличаются от спектров частиц, которые не растут при нагреве.

С учётом всего вышесказанного, можно рассмотреть возможные гипотезы о природе ТЗР бицелл и выбрать наименее противоречивую. Во-первых ТЗР может возникать из-за смешивания между липидами и детергентами в бицеллах. Эта гипотеза предлагалась в работе Li с соавторами [83]. Действительно, сегрегация липидов и детергентов приводит к значительному понижению энтропии системы. Поскольку вклад от изменения энтропии

линейно растёт с температурой, смешивание должно усиливаться при нагреве. Однако, в этом случае ТЗР бицелл не должен зависеть от концентрации, таким образом, гипотеза о смешивании не подтверждается данными экспериментов. Явная зависимость ТЗР от концентрации позволяет предположить, что ТЗР возникает из-за процесса, происходящего при соударениях бицелл. Этот процесс должен быть обратимым, все эксперименты проводились при изменении температуры в случайном направлении, а в некоторых случаях изменение температуры производили несколько раз в различных направлениях и это никак не влияло на наблюдаемые размеры частиц. Наиболее правдоподобным объяснением является слияние частиц при соударении, которое можно рассмотреть как процесс обратимой "димеризации" бицелл, с некоей константой равновесия. Тогда, повышение концентрации будет смещать равновесие в сторону "димерных" бицелл, что будет приводить к увеличению радиуса частиц при высоких концентрациях. При этом, константа равновесия должна сильно зависеть от концентрации и от свойств обода бицеллы. Можно предположить, что вероятность такого слияния бицелл должна зависеть от упругости соударений между частицами, и, следовательно, от параметров упаковки липидов, заряда поверхности обода и других параметров частиц. Это может объяснить влияние температуры и структуры ацильных цепей на амплитуду ТЗР - липиды с низкой температурой фазового перехода хуже упакованы в бицеллах, поэтому вероятность слияния при соударении возрастает. Точно также, при повышении температуры падает плотность упаковки бислоя, что приводит к менее упругим соударениям. С другой стороны, вероятность слияния бицелл должна зависеть и от заряда обода. Именно поэтому, Façade-EPC, несущий два заряженных остатка фосфохолина резистентен к ТЗР, в то время как неионный детергент Façade-EM со схожей структурой образует бицеллы, которые растут при нагревании. При этом очевидно, что такие "слитые" бицеллы не могут иметь "идеальную" дисковидную форму, вероятнее всего, в них должны возникать перфорации, образованные излишком детергента. Это объясняет отсутствие ТЗР в малых бицеллах, даже при слиянии бицелл размер участка липидного бислоя оказывается слишком мал, чтобы в нем могла образоваться перфорация.

4.13. Сравнение различных ободообразующих агентов

Можно заключить, что накопленной информации достаточно, для того, чтобы провести сравнение различных детергентов в качестве ободообразующих агентов для бицелл. Поскольку исследовались именно малые изотропные бицеллы, которые используют для исследования структуры МБ методами ЯМР-спектроскопии, можно предложить критерии для сравнения, основанные на удобстве мембраноподобных сред для целей структурных исследований.

Наиболее очевидным критерием является размер частиц, поскольку размер объекта является основным препятствием для исследований при помощи ЯМР. В случае бицелл, поскольку их размер легко варьировать в широком диапазоне, в первую очередь важна толщина обода. Чем тоньше обод частицы, тем больше в ней содержится липидов при том же размере всей бицеллы. В этом смысле, оптимальными оказываются такие детергенты как DHPC(1.15 нм), CHAPS/CHAPSO (1.3 нм) и Façade-EPC (1.25 нм), Façade-EM заметно проигрывает.

Вторым параметром является ККМ детергента. Чем ниже ККМ, тем меньше будет концентрация свободного детергента в бицеллах и тем легче будет контролировать размер частиц при низких концентрациях бицелл. С точки зрения ККМ, наиболее выгодно смотрятся детергенты Façade, а хуже всего - DHPC.

Третий параметр - "жёсткость" детергента. Жёсткие детергенты могут нарушать структуру растворимых доменов белка. В изученном ряду наиболее жёстким является DHPC, а наиболее мягкими являются CHAPS и Façade. В литературе можно встретить много упоминаний о том, что бицеллы на основе CHAPSO дольше сохраняют активность встроенных в них МБ и обеспечивают лучшую термостабильность, чем DHPC [96,432,433]. По данным представленной работы, наиболее мягким детергентом для бицелл является Façade-EM, что было показано в разделе 4.9. Если обобщить, то с точки зрения стабильности, применение детергентов на основе плоских амфифилов более выгодно, чем использование DHPC.

Четвертый параметр - упаковка липидов. В настоящей работе однозначно показано, что бицеллы на основе CHAPS обеспечивают более плотную упаковку липидов, чем DHPC, что выражается в усилении ЯЭО между протонами липидов и белка, а также в уменьшении подвижности белка, встроенного в бицеллы на основе CHAPS. Если проанализировать спектры ^{31}P различных бицелл в ж.-к. состоянии, то можно увидеть два кластера зависимостей хим. сдвига от температуры: один кластер соответствует частицам, сформированным с участием DHPC и содержит также Façade-EM, в то время как другой кластер соответствует бицеллами на основе CHAPS и содержит также Façade-EPC и ЛБН. Предполагая, что спектры ^{31}P отражают параметры упаковки липидов в бислое, можно ожидать более плотную упаковку в бицеллах CHAPS и Façade-EPC, а также в ЛБН.

Для многих типов исследований при помощи ЯМР важным свойством детергента является его доступность в дейтерированном виде. Дейтерирование позволяет оптимизировать поперечную релаксацию МБ, а также удалить из спектров ^{1}H,^{13}C-HSQC интенсивные и узкие сигналы от CH_2 групп липидов на натуральном содержании. Такие сигналы является причиной

возникновения T_1-шума и других артефактов в трехмерных спектрах, что приводит к потере важной информации о пространственной структуре белка. Из всех перечисленных вариантов, дейтерированные производные можно приобрести только для DHPC.

Наконец, в современных условиях, наиболее важным свойством детергента является его стоимость. Самыми дорогими из перечисленных являются детергенты Façade, затем идут DHPC, CHAPSO и CHAPS (Таблица 7). При этом CHAPSO стоит в 4 раза дороже, чем CHAPS. В литературе не удалось найти объяснение тому, что в большинстве работ, связанных с анизотропными бицеллами, именно CHAPSO используется для формирования обода частиц. Очевидно, что в случае малых изотропных бицелл CHAPSO и CHAPS абсолютно идентичны, следовательно, CHAPSO необходимо исключить из списка обод-образующих агентов в силу высокой цены.

Таблица 7. Стоимость ободообразующих агентов для бицелл в долларах США за 1г вещества. Цена пересчитывается из стоимости упаковки максимального размера, по данным Avanti Polar lipids и не включает стоимость доставки на территорию РФ (www.avantilipids.com).

Детергент	**Цена USD, ^{1}H, за 1г**	**Цена USD, ^{2}H, за 1г**
DHPC	350	13 700 D_{22}/17 000 D_{40}
CHAPS	43	-
CHAPSO	115	-
Façade-EPC	6360	-
Façade-EM	2000	-

Таким образом, можно заключить, что CHAPS является наиболее предпочтительным детергентом с точки зрения соотношения цена/качество - он достаточно "мягок" и не денатурирует белки, формирует стабильные бицеллы с плотной упаковкой липидов, характеризуется сравнительно невысокой ККМ и чрезвычайно дешёв. DHPC следует использовать, если дейтерирование посторонних компонентов необходимо. Façade дороги, но при этом могут использоваться, если никакие другие детергенты не способны сохранить активность целевого белка. Иными словами, для "стандартного" исследования структуры МБ, следует выбирать CHAPS для формирования бицелл и рассматривать другие варианты лишь при особой необходимости, DHPC - если белок не содержит водорастворимых доменов и

необходимо дейтерирование липидов и Façade-EM если белок склонен к денатурации из-за детергентов. Перспективы применения Façade-EPC неясны.

4.14. Критерии корректности формирования бицелл.

В работе приводится информация о свойствах ряда смесей липидов и детергентов, которые наиболее часто применяются для изучении пространственных структур мембранных белков, в качестве липида опробованы несколько фосфатидилхолинов. Однако, необходимо отметить, что структура в единственном окружении не всегда предоставляет достаточное количество информации для понимания принципов работы МБ. Очевидно, что МБ, находясь в клеточной мембране, могут мигрировать между различными микродоменами, которые характеризуются разной толщиной липидного бислоя, упаковкой липидов, зарядом головных групп. Более того, зачастую МБ могут специфически взаимодействовать с липид-растворимыми молекулами, например фосфолипидами с головными группами на основе инозина, ганглиозидами и холестерином [434,435]. Активация ряда белков напрямую связана с переходом их в "рафты" клеточной мембраны в результате таких взаимодействий [436]. Поэтому, желательно иметь возможность готовить изотропные бицеллы, содержащие анионные липиды, сфингомиелин, фосфатидилэтаноламин, холестерин, ганглиозиды и другие важнейшие компоненты клеточных мембран. В литературе есть примеры формирования бицелл из реальных мембран прокариот [95], однако такой подход, хоть и предоставляет МБ окружение, близкое к нативному, не позволяет вычленить влияние конкретных факторов на поведение белка. Более того, параметры частиц, формируемых в таких растворах, не изучались. Поэтому, в данной работе, предлагается исследовать поведение бицелл на основе различных липидов, как в отдельности, так и в смесях, предварительно выработав критерии оценки "идеальности" частиц, на основе описанных выше результатов. Это не только позволит понять, какие липиды можно и какие - нельзя использовать для моделирования клеточной мембраны в бицеллах, но и оценить степень того, насколько бицеллы способны воспроизводить свойства липидных мембран различного состава.

Итак, согласно представленным данным, некоторые смеси липидов и детергентов могут корректно образовывать бицеллы - частицы, содержащие участок липидного бислоя и обод из молекул детергента. Такие выводы были сделаны на основании двух типов измерений - зависимостей R(q) и спектров ^{31}P, именно эти данные и предлагается использовать в качестве критериев "корректности" структуры изотропных бицелл произвольного состава. Иными словами, **смесь липид/детергент образует изотропные бицеллы в том случае, если**

зависимость R(q) можно аппроксимировать моделью идеальной бицеллой с разумными параметрами, а также если липиды в таких частицах претерпевают фазовый переход при температурах, близких к критической точке липида в бислое. Под разумными параметрами, подразумеваются параметры, не противоречащие представлениям о структуре молекул липида и детергента. Так, например, можно привести пример смесей DMPC/DH_7PC, в которых наблюдаются фазовые переходы, однако параметры модели идеальной бицеллы лишены физического смысла: толщина обода составляет 2.0 нм вместо ожидаемых 1.4, а объем молекулы DH_7PC оказывается в 1.6 раз больше, чем объем DMPC, что невозможно. Также, в качестве подтверждения применимости указанных критериев, можно изучить поведение смесей, которые заведомо не образуют бицеллы - например, смеси DMPC/SDS. Для данного состава таже были приготовлены несколько растворов с q от 0.1 до 0.5. Для малых q зависимость R(q) была вписана в модель бицеллы с тороидальным ободом (7) со параметром r=3.1 нм (Рис. 53), что существенно превышает даже длину молекулы DMPC (2.0-2.2 нм), при этом не наблюдалось никаких фазовых переходов, даже при 5 ºC в частицах радиусом свыше 5 нм. Таким образом, когда бицеллы не образуются, это проявляется либо в характере зависимости R(q) либо в параметрах спектров ЯМР ^{31}P.

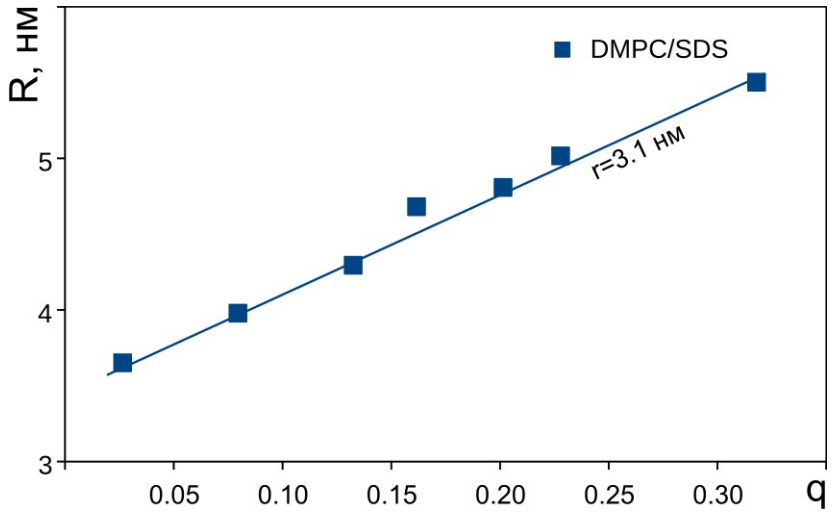

Рисунок 53. Зависимость радиуса частиц в смесях DMPC/SDS от соотношения липид/детергент, измеренная по данным диффузионной спектроскопии ЯМР при 20 ºC. Линией показан результат аппроксимации экспериментальных точек моделью идеальной бицеллы (7).

Руководствуясь указанными критериями было проведено исследование свойств частиц в бицеллах на основе различных липидов.

4.15. Поведение изотропных бицелл из наиболее распространённых липидов.

Поскольку ранее были показаны преимущества CHAPS в качестве ободообразующего агента для бицелл, дальнейшая работа проводилась в бицеллах, сформированных с использованием именно этого детергента. В первую очередь были изучены различные цвиттерионные липиды, затем - анионные.

4.15.1. Этаноламины

Фосфатидилэтаноламины (ФЭ) - цвитерионные липиды, схожие с фосфатидилхолинами (ФХ), однако в полярной головке таких липидов недостаёт трёх метильных групп. Из-за этого ФЭ имеют коническую форму и формируют гексагональную фазу. В клеточных мембранах ФЭ поддерживают кривизну мембраны и находятся в основном во внутреннем слое липидов. В смесях с детергентами ФЭ также ведёт себя нестандартно: при различных q смеси DMPE/CHAPS и DMPE/DHPC становятся мутными при температурах ниже 40 ºC, липиды выпадают в осадок, то есть DMPE не может образовать бицеллы при температурах ниже точки фазового перехода. Можно встроить до 20% DMPE в бицеллы DMPC/CHAPS, но такие частицы также оказываются нестабильными при температуре ниже 40 ºC. Таким образом, ФЭ, в силу особенностей свой структуры, не подходят для приготовления бицелл, как по отдельности, так и в смесях с другими фосфолипидами.

4.15.2. Сфингомиелины

Сфингомиелины (СМ) - цвитерионные липиды, характерные для рафтов [181]. Благодаря этому, СМ могут быть перспективным компонентом бицелл для моделирования микродоменов клеточной мембраны. Различные экстракты СМ (индивидуальные СМ чрезмерно дороги) уже использовались ранее для приготовления изотропных бицелл, в частности, для исследования белка Notch, структура частиц при этом не изучалась. Для изучения бицелл на основе СМ были приготовлены несколько смесей СМ/CHAPS с q от 0.5 до 1.5, в которых проводились измерения размера частиц и спектров ^{31}P в зависимости от температуры.

Как оказалось, СМ воспроизводит все ключевые особенности поведения ФХ в изотропных бицеллах. Зависимость R(q) оказалась практически идентичной кривой для DPPC/CHAPS с выраженным ТЗР при q>1 (Рис. 54). Аппроксимация экспериментальных точек моделью идеальной бицеллы (8) позволила получить следующие параметры: $\lambda = 1.66 \pm 0.04$, $r = 1.40 \pm 0.02$ нм при 35 ºC и $\lambda = 1.18 \pm 0.26$, $r = 1.15 \pm 0.13$ нм при 50 ºC, что также близко к параметрам бицелл DPPC/CHAPS (Табл. 6). Концентрация детергента в мономерной форме

оказалась одинаковой в бицеллах ФХ/CHAPS и СМ/CHAPS, со схожей зависимостью от q и температуры (Рис. 55А).

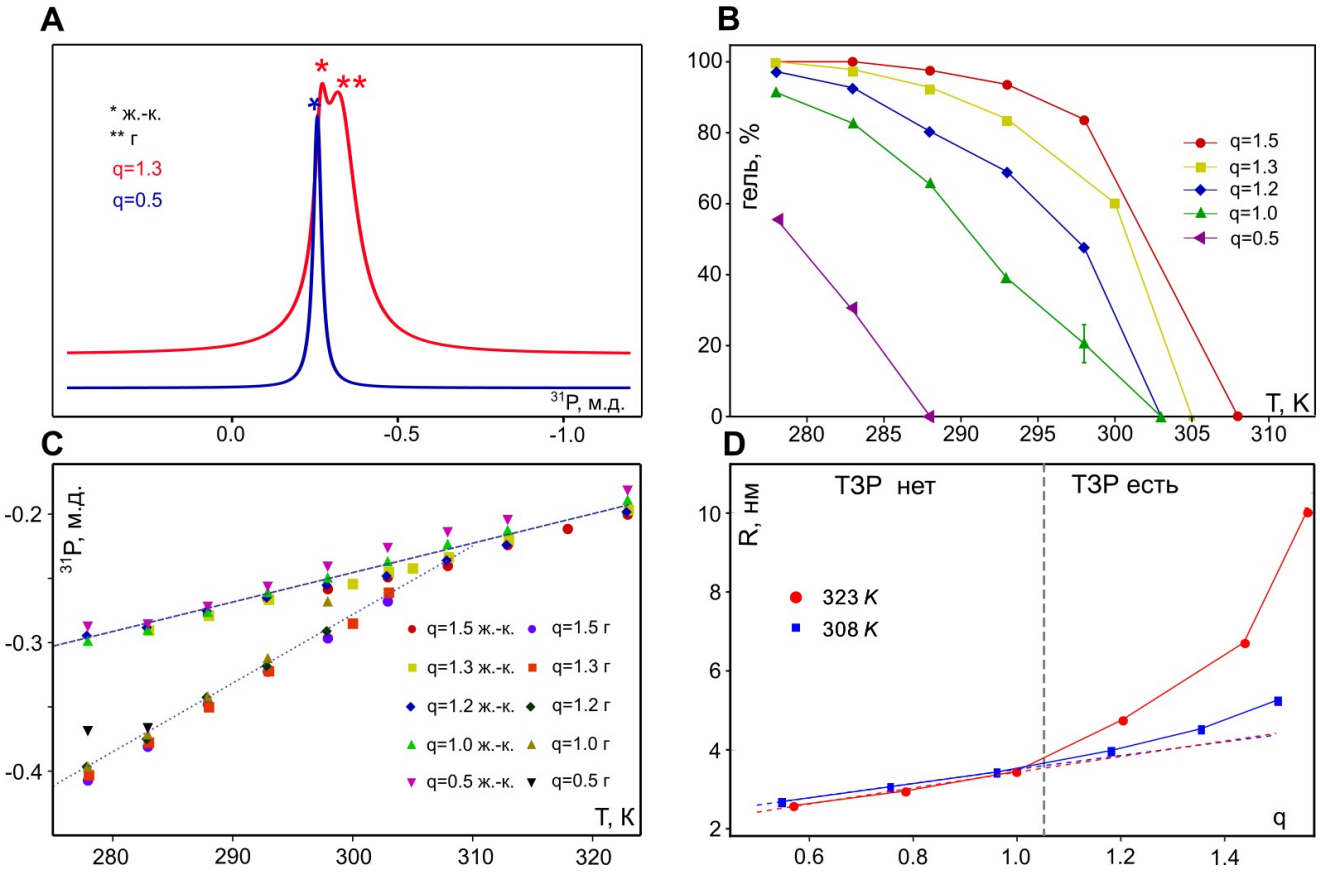

Рисунок 54. А - суперпозиция спектров ^{31}P ЯМР бицелл СМ/CHAPS q=1.3 (красным) и q=0.5 (синим) при 20 ºС. Пики отмеченные * и ** соответствуют СМ в ж.-к. и гелевой фазе, соответственно. **B** - доля СМ в гелевом состоянии в бицеллах СМ/CHAPS при различных соотношениях q и температурах. **C** - зависимость химических сдвигов ^{31}P СМ в бицеллах СМ/CHAPS q=0.5-1.5 от температуры в гелевом и ж.-к. состояниях. **D** - зависимости R(q), измеренные для бицелл СМ/CHAPS при 35 (синие точки) и 50 (красные точки) ºС. Пунктирными линиями показан реультат аппроксимации точек, для которых не наблюдается ТЗР, моделью идеальной бицеллы (8).

Спектры ^{31}P четко отражают фракционный фазовый переход, который наблюдается для всех опробованных значений q, при понижении q происходит понижение эффективной критической температуры. Как видно из рис. 51 В, доля СМ в гелевом состоянии уменьшается при титровании бицелл CHAPS. Анализ зависимости химических сдвигов ^{31}P от температуры не выявляет различий между параметрами упаковки СМ в бицеллах большого и малого размера. Все приведенные данные свидетельствуют в пользу корректного формирования бицелл из СМ.

Для изучения возможности имитации рафтов, СМ бы смешан с холестерином в присутствии CHAPS. К сожалению, такие растворы оказались нестабильны, даже в присутствии

малых количеств холестерина (5-10 %) происходило выпадение осадка. Вероятнее всего, жидко-упорядоченная фаза липидов, которая возникает в смесях СМ/холестерин [437], несовместима с бицеллярной структурой частиц, вместо которых образуются крупные ламеллы. Точно также, образцы, содержавшие более сложную смесь DPPC/СМ/Холестерин/CHAPS 1:1:1:2 были мутными, что свидетельствует об образовании больших частиц радиусом свыше 100 нм. При этом, частицы, которые наблюдаются в спектрах ЯМР характеризуются соотношением q=0.3, вместо изначальных 1.5. Следовательно, в образце наблюдается сегрегация и присутствует популяция малых бицелл с q=0.3 и популяция крупных агрегатов, которые не видны в спектрах ЯМР, но видны невооружённым глазом. Два вида частиц находятся в равновесии - после центрифугирования получается прозрачный раствор, который снова мутнеет в течение нескольких минут, при этом вторым, скорее всего, соответствует жидко-упорядоченная фаза липидного бислоя. Такое поведение в целом ожидаемо, поскольку микродомены клеточной мембраны, богатые СМ и холестерином, как известно, не растворяются в мягких детергентах и образуют крупные фрагменты мембраны при смешивании с CHAPS [438]. Более того, это свойство упорядоченных фрагментов мембраны легло в основу первых методов обнаружения микродоменов.

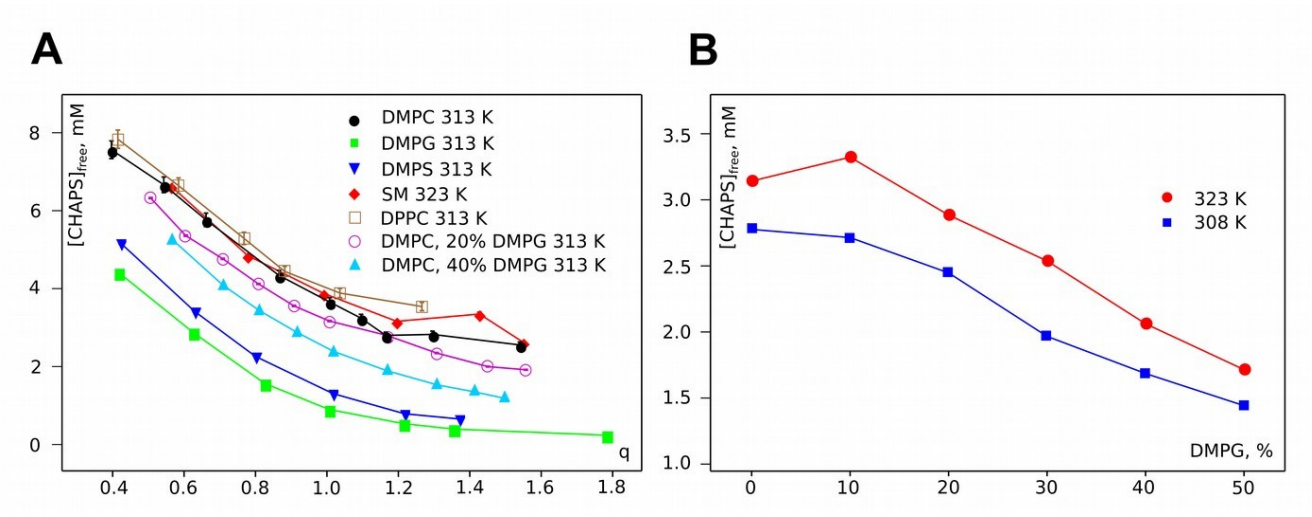

Рисунок 55. А - зависимость концентрации CHAPS в мономерной форме от q для бицелл различного состава при 40-50 ºС. **В -** зависимость концентрации CHAPS в мономерной форме от содержания DMPG в бицеллах DMPC/DMPG/CHAPS при 35 и 50 ºС.

Таким образом, можно заключить, что следует избегать использования ФЭ в бицеллах, при этом СМ могут применяться, однако, воспроизвести условия рафтов клеточной мембраны в бицеллах не представляется возможным.

4.15.3. Анионные липиды

Липиды с отрицательно заряженными головными группами также являются важными компонентами липидных мембран, их содержание в клеточных мембранах в среднем составляет около 20% [439]. В первую очередь, такие липиды вносят заряд на поверхность бислоя, что приводит к возникновению важных и функционально значимых взаимодействий с периферическими МБ и примембранными регионами интегральных МБ [440,441]. Большинство МБ содержат положительно заряженные и ароматические аминокислоты на интерфейсе липид/вода, считается, что асимметричное расположение заряженных липидов на внешнем и внутреннем слоях клеточной мембраны, может управлять топологией и стабильностью МБ [442]. Ранее было показано, что анизотропные бицеллы могут включать в себя анионные фосфолипиды [90], а в литературе можно встретить исследования пространственной структуры МБ, проведённые в изотропных бицеллах из анионных липидов [443], однако структура подобных частиц отдельно не изучалась. В данном разделе описывается исследование свойств бицелл из DMPG и DMPS в смесях с CHAPS.

В липидных бислоях свойства ФХ и анионных липидов, таких как фосфатидилсерины (ФС) и фосфатидилглицерины (ФГ) схожи - фазовые переходы происходят при той же температуре. Однако, в бицеллах этого не наблюдалось. В первую очередь зависимости R(q) далеки от предсказанных в соответствии с идеальной моделью (8). Частицы образуются гораздо большего радиуса, чем бицеллы DMPC/CHAPS аналогичного q, а ТЗР не наблюдается (Рис. 56). Вместо ожидаемой линейной зависимости обнаружена сильно выгнутая кривая. Более того, ни один из приготовленных образцов никак не демонстрирует наличия фазовых переходов вплоть до 5 ºC, включая как частицы на основе CHAPS, так и бицеллы DHPC. Увеличение ионной силы раствора, добавление 100 мМ NaCl, не влияет на фазовое поведение липидов. Таким образом, липиды с головными группами на основе ФС и ФГ не формируют изотропные бицеллы, а скорее частицы с выраженным смешиванием между липидом и детергентом. Это подтверждается концентрацией детергента в мономерной форме, которая существенно понижена в случае ФС/ФГ бицелл по сравнению с частицами из ФХ (Рис. 55А). Скорее всего, электростатическое расталкивание заряженных головок не допускает плотной упаковки липидов в бислой в отсутствие латерального давления. Эту проблему можно преодолеть, смешивая анионные липиды с цвиттерионными, поэтому было проведено исследование смешанных бицелл, чтобы понять, можно ли вообще включать заряженные липиды в состав изотропных бицелл.

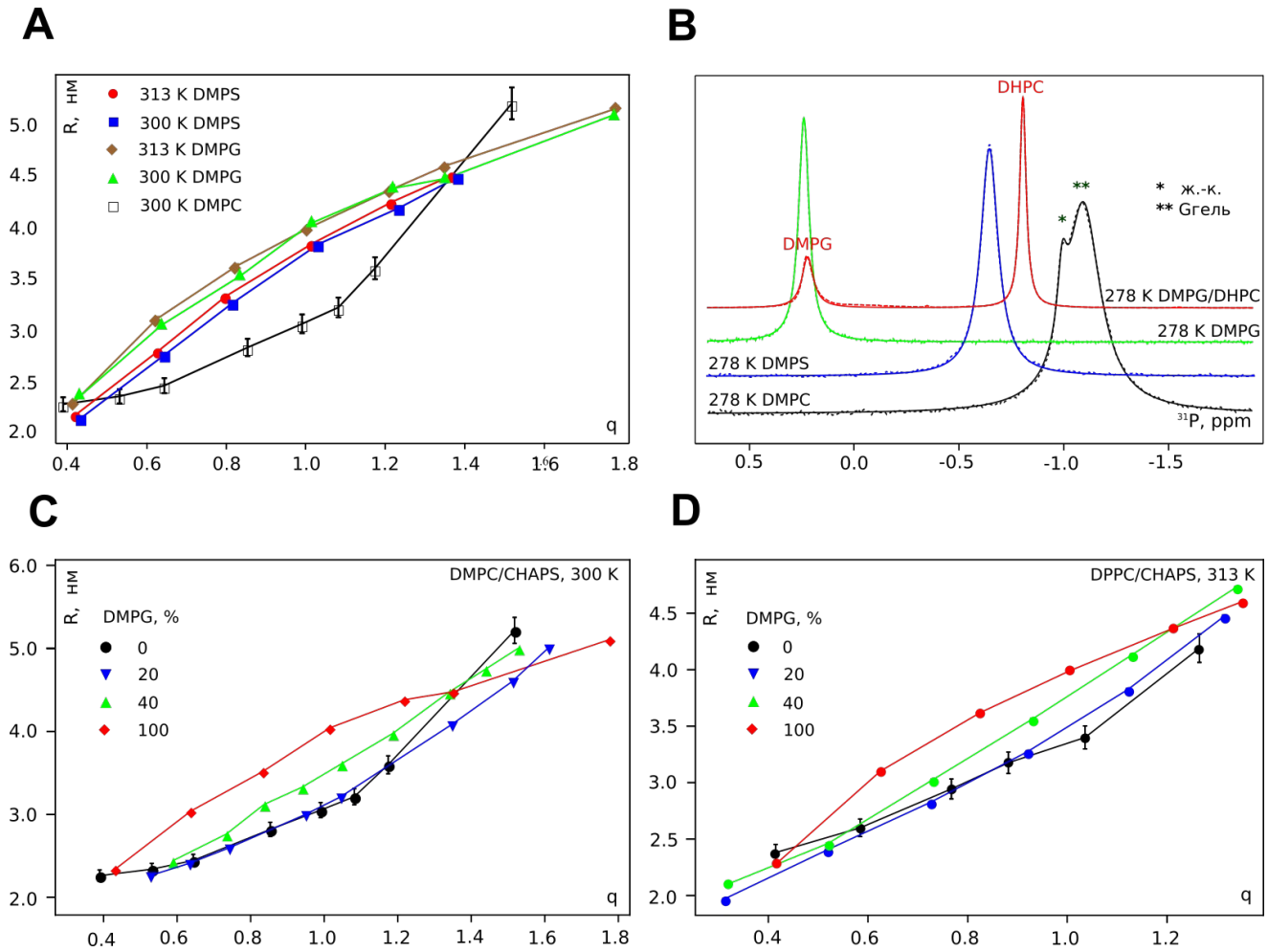

Рисунок 56. A - зависимости R(q), измеренные для бицелл DMPS/CHAPS (показаны красным и синим) и DMPG/CHAPS (коричневым и зеленым), а также DMPC/CHAPS (черным). **B** - спектры ^{31}P, полученные для бицелл DMPG/DHPC q=0.6 , DMPG/CHAPS, DMPS/CHAPS и DMPC/CHAPS все - q=1.5 при 5 ºC. * и ** отмечены пики, соответствующие ж.-к. и гелевой фазам липидов. **C,D** - зависимости R(q), измеренные для бицелл DMPC/DMPG/CHAPS (27 ºC, **C**) и DPPC/DMPG/CHAPS (40 ºC, **D**).

4.15.4 Смешанные бицеллы ФХ/ФГ

В первую очередь были получены смеси DMPC/DMPG/CHAPS, содержащие от 20 или 40 % заряженных липидов, для которых была измерена зависимость R(q) при 27 и 40 ºC (рис. 56 C). Поскольку параметры DMPG и DMPC практически идентичны, можно ожидать схожие зависимости при образовании "идеальных бицелл". Как можно увидеть на рисунке 52, бицеллы с 20% DMPG практически идеально воспроизводят поведение цвитерионных бицелл при 27 ºC и оказываются слегка больше при 40 ºC. Для таких частиц ТЗР наблюдается, но амплитуда эффекта понижена при высоких q, что можно объяснить электростатическим расталкиванием частиц, что понижает вероятность слияния при соударениях. С другой стороны, смеси с 40%-

содержанием DMPG проявляют усреднённые параметрами между 100% DMPC и 100% DMPG, при полном отсутствии ТЗР частиц, что можно интерпретировать как изменения в морфологии частиц, происходящие при повышенном содержании заряженных головных групп. Так, если при 20% анионных липидов формируются изотропные бицеллы, при повышенном содержании начинают образовываться частицы с изменённой морфологией и выраженным смешиванием между липидом и детергентом. Что касается концентрации CHAPS в растворе, этот параметр бицелл изменяется постепенно, уменьшаясь с увеличением содержания DMPG (Рис. 58В), плато наблюдается только при содержании 0-10%, что показывает отсутствие резкого изменения параметров упаковки CHAPS в ободе бицелл с заряженными липидами. Понижение концентрации CHAPS в растворе скорее всего вызвано более благоприятным взаимодействием между детергентом и заряженными головными группами ФГ, чем с цвиттерионными ФХ.

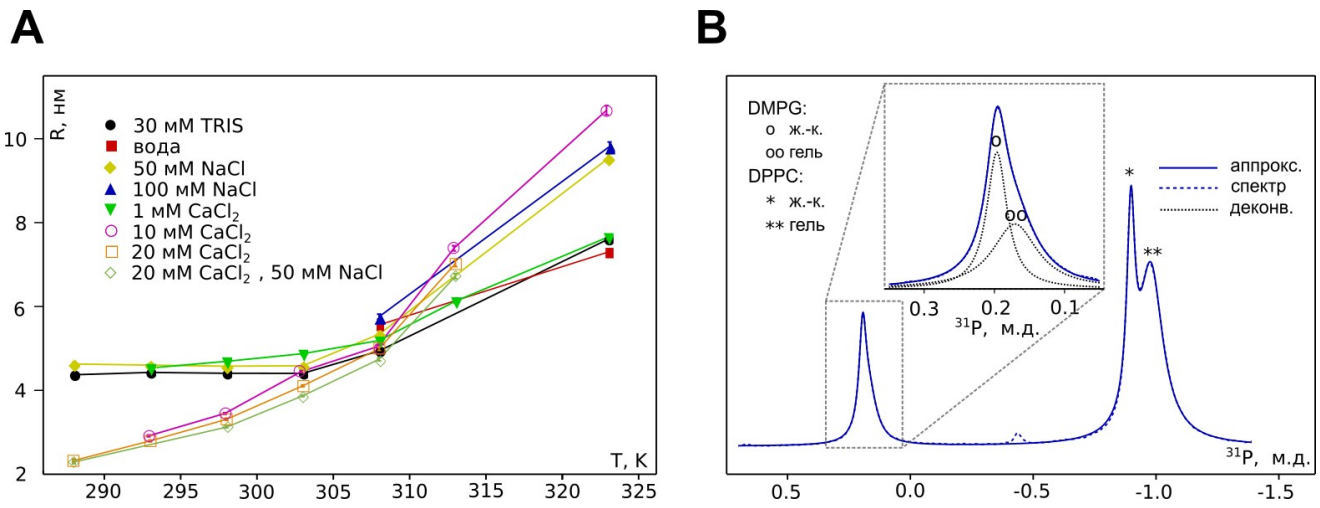

Рисунок 57. А - зависимости R(T), измеренные для бицелл DMPG/DPPC/CHAPS 1:4:7.5 в буферах различного состава. Уменьшение радиуса при охлаждении, наблюдаемое при некоторых условиях, отражает выпадение липида в осадок. **В -** спектр ^{31}P бицелл DMPG/DPPC/CHAPS 1:4:7.5 при 25 ºC. Синей линией показан результат аппроксимации спектра четырьмя лоренцевыми линиями, синей пунктирной линией показан спектр, чёрной пунктирной линией - отдельные компоненты деконволюции сигнала от фосфатной группы DMPG.

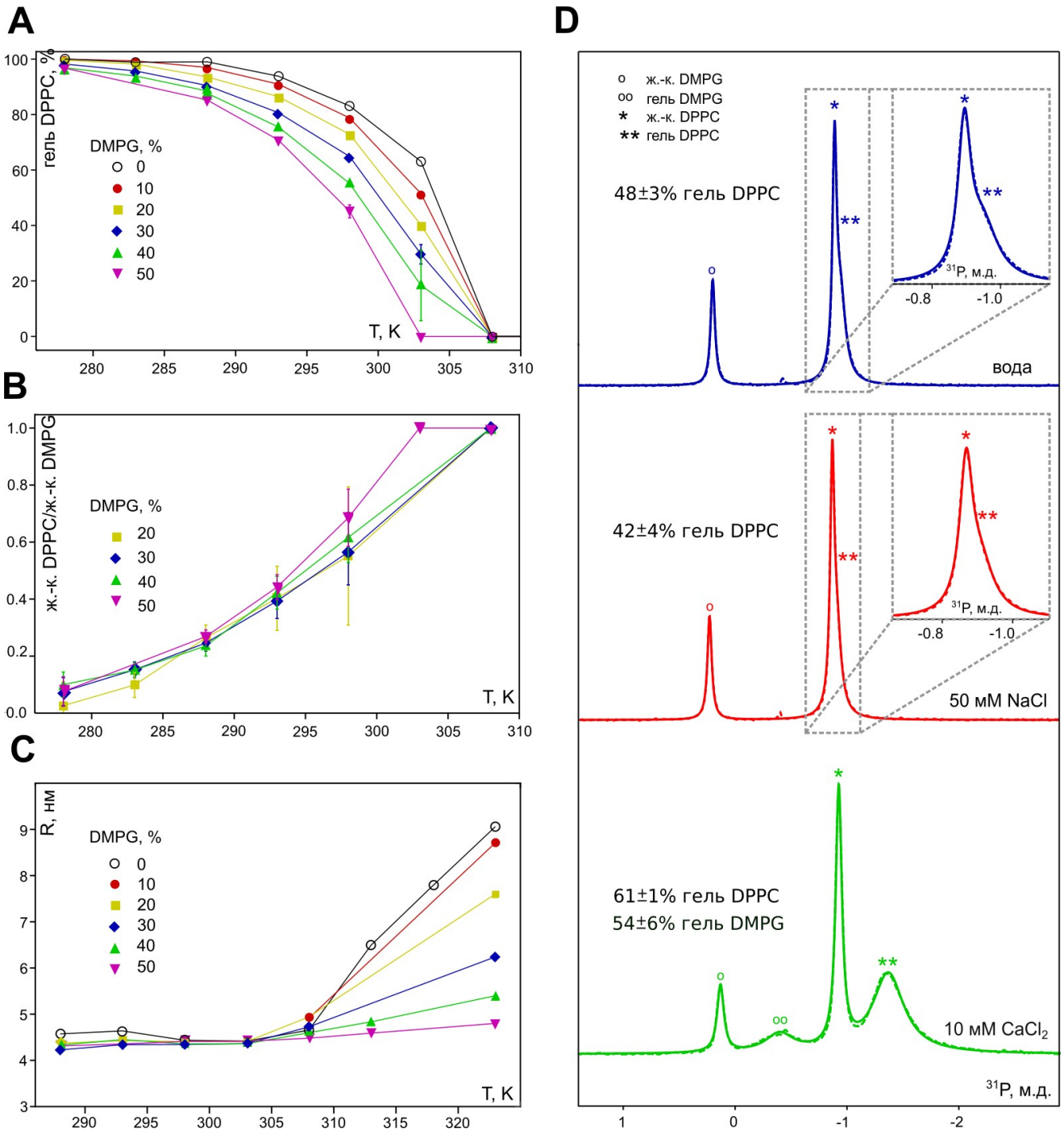

Рисунок 58. A - зависимость количества DPPC в гелевой фазе от температуры и содержания DMPG в смешанных бицеллах DPPC/DMPG/CHAPS q=1.5. **B** - зависимость отношения доли ж.-к. DPPC к доле ж.-к. DMPG от температуры и содержания DMPG в смешанных бицеллах DPPC/DMPG/CHAPS q=1.5. **C** - Зависимость радиуса бицелл DPPC/DMPG/CHAPS q=1.5 от температуры и содержания DMPG. **D** - спектры ^{31}P бицелл DMPG/DPPC/CHAPS 1:4:7.5 при 30 ºC в воде (сверху), в 50 мМ NaCl (в центре) и в 10 мМ $CaCl_2$ (внизу). Спектр показан пунктирной линией, результат аппроксимации спектра лоренцевыми линиями показан непрерывной линией, * и ** обозначают сигналы от DPPC в ж.-к. и гелевом состояниях, o и oo обозначают сигналы от DMPG в ж.-к. и гелевом состояниях.

Следующим шагом было проведено исследование фазовых переходов в смешанных бицеллах ФХ/ФГ. Для этого, DMPG смешивали с DPPC и измеряли спектры ^{31}P при различных температурах, от 5 до 60 ºC. DPPC гораздо лучше подходит для целей данной работы, чем DMPC в силу высокой точки фазового перехода, что позволяет проводить измерения в широком диапазоне температур. Спектры ^{31}P выявили наличие двух хорошо разрешённых сигналов от фосфатных групп DPPC и DMPG, оба сигнала расщепляются на узкий и широкий пики от липидов в гелевом и ж.-к. состояниях при температуре ниже 30 ºC (Рис. 57). В то время как в бислоях DMPG фазовые переходы происходят при 23 ºC, в смешанных бицеллах пик от гелевого состояния DMPG наблюдается уже при 25 ºC. Присутствие DMPG в гелевом состоянии в смесях ФХ/ФГ, в отличие от смесей ФГ/CHAPS, свидетельствует об образовании бицелл. Деконволюция спектров позволила провести количественный анализ фазовых переходов. Добавление DMPG понижает эффективную температуру перехода, это чётко видно на рис. 58A. Это ожидаемо, поскольку критическая температура DMPG почти на 20 ºC ниже, чем у DPPC. Отношение между долей ФГ в ж.-к. форме и долей ФХ в ж.-к. форме, постепенно уменьшается от 1 при 37 ºC, когда оба липида полностью находятся в ж.-к. состоянии, до 0 при 5 ºC, когда весь DPPC оказывается в гелевом состоянии, в то время как часть DMPG все еще в ж.-к. фазе (рис. 58B). Данное наблюдение показывает понижение смешиваемости и некоторую степень сегрегации между DPPC и DMPG при охлаждении системы. Важно, что отношение ж.-к. ФХ к ж.-к. ФГ одинаково зависит от температуры для всех изученных составов. Иными словами, даже включение 50% DMPG в бицеллы DPPC/CHAPS не влияет существенным образом на фазовое поведение смешанных бицелл, а просто понижает эффективную критическую температуру, не изменяя профиль смешивания ФХ/ФГ. Измерение диффузии липида в таких смесях показывает, что добавление DMPG подавляет ТЗР, но критическая температура ТЗР не меняется и составляет около 33 ºC. Таким образом, исследование фазовых переходов показывает, что в смесях ФХ/ФГ/CHAPS образуются частицы с участком липидного бислоя и одинаковыми параметрами смешивания ФХ/ФГ, вплоть до содержания анионных липидов 50%. При этом, изменения зависимости R(q) можно связать с существенно иными параметрами упаковки липидов с заряженными головками в бицеллах, по сравнению с бислоем.

Известно, что анионные липиды в бислоях подвержены влиянию однозарядных и двузарядных катионов [444,445]. Двузарядные катионы стабилизируют бислой, повышая температуру фазового перехода, в то время как однозарядные ионы понижают критическую температуру. Доказанное образование бицелл в смесях DMPG/DPPC/CHAPS позволяет изучить влияние катионов на фазовое поведение бислоя в таких частицах. Были исследованы образцы,

содержащие 20% DMPG при pH 7.0 в присутствии (1) 30 мМ TRIS, (2) 50 или 100 мМ NaCl, (3) 1, 10, 20 $CaCl_2$ (4) 20 мМ $CaCl_2$ и 50 мМ NaCl и в чистой воде (5). Добавление NaCl не оказывало значительного влияния на фазовое поведение липидов, однако резко усиливало ТЗР (Рис. 59), что согласуется с выдвинутой ранее гипотезой: ТЗР ослабляется за счёт электростатического расталкивания, в то время как добавление соли экранирует заряд поверхности бицелл. Добавление 10 мМ $CaCl_2$ также оказывало похожее влияние на ТЗР, при этом фазовое поведение обоих липидов разительно отличалось. В спектре ^{31}P бицелл уже при 30 ^{o}C появляется интенсивный пик от гелевого состояния DMPG, который сильно смещён в слабое поле (на 0.4 м.д.), как и сигнал от гелевой формы DPPC. При этом, доля DPPC в гелевой фазе значительно возрастает - с 48±3 % в отсутствие соли до 61±1 % в присутствии 10 мМ $CaCl_2$ (Рис. 58). Положение узких пиков в спектрах не изменяется, можно предположить, что параметры ж.-к. состояния липидов в бицеллах не подвержены влиянию двузарядных катионов. Также при добавлении $CaCl_2$ происходит выпадение липидов в осадок при температурах ниже 20 ^{o}C, что делает двузарядные ионы нежелательными компонентами образцов бицелл. Резюмируя, изучение влияния катионов/ионной силы раствора на свойства бицелл показывает, что основные черты фазового поведения липидов в бислоях воспроизводятся в изотропных бицеллах - двузарядные катионы повышают эффективную температуру фазового перехода липидов, стабилизируя гелевое состояние, вероятнее всего за счет взаимодействий с фосфатными группами ФХ и ФГ.

Следует отметить, что исследование смесей DMPC/DMPC и DPPC/DMPG проводились разными методами и результаты не могут напрямую сопоставлены друг с другом, поскольку взаимодействие между двумя компонентами бицелл может сильно разниться для указанных смесей. Поэтому, зависимости R(q) были измерены и для бицелл DMPG/DPPC/CHAPS с молярным содержанием анионных липидов 20 и 40 %, полученные данные представлены на рисунке 56 D. Как видно, размер бицелл DMPG/DMPC и DMPG/DPPC схожим образом зависит от соотношения q и доли заряженных головных групп. При 20% кривая практически воспроизводит зависимость для цвитерионных бицелл, при 40% наблюдается усредненное поведение. Это позволяет заключить, что выводы о свойствах смешанных бицелл ФХ/ФГ, полученный по результатам измерения зависимости R(q) и спектров ^{31}P являются универсальными.

Суммируя раздел 4.15.4 можно заключить, что смеси ФХ/ФГ с CHAPS образуют частицы, в которых наблюдаются фазовые переходы между гелевым и ж.-к. состоянием липидов, частицы имеют размер, характерный для изотропных бицелл. При этом, многие

параметры липидных бислоев - фазовое поведение в зависимости от состава смеси, температуры и наличия однозарядных и двузарядных катионов, - воспроизводятся в изотропных бицеллах, что в очередной раз подтверждает адекватность бицелл в качестве мембраноподобной среды для структурных исследований МБ. Не смотря на то, что нельзя сделать однозначного вывода о структуре бицелл, приготовленных исключительно из анионных фосфолипидов, заряд нативных клеточных мембран можно моделировать, добавляя 20-40% анионных липидов в бицеллы из ФХ.

4.15.5 Смешанные бицеллы из липидов с различными ж.-к. остатками.

Помимо смесей липидов с различными головными группами, можно рассмотреть бицеллы, приготовленные из липидов с различными ацильными цепями. Ранее уже приведено описание бицелл с различными ФХ, приготовленных из одного липида, в текущем разделе представлены результаты изучения бицелл, в которых смешиваются ФХ с существенно разными параметрами - POPC (критическая температура -2 ºC) и DPPC (41 ºC). При этом толщина бислоя DPPC и POPC примерно одинакова. Фазовое поведение таких смесей в больших везикулах достаточно сложное - наблюдается смещение температуры основного фазового перехода в область более низких температур, по сравнению с чистым DPPC, а также наблюдается определённый уровень сегрегации липидов и сосуществование различных фаз в широком диапазоне температур [446]. В представленной работе были исследованы смеси POPC/ DPPC/CHAPS с молярным содержанием POPC 20 или 40 % и q=1.5

Спектры ^{31}P, измеренные ниже критической точки DPPC выявляют два пика, соответствующих ж.-к. и гелевому состоянию липидов (Рис. 59). Доля липидов в гелевой форме при 5 ºC достигает 80-90 %, то есть данный пик соответствует как DPPC, так и POPC, который переходит в гелевое состояние выше своей критической точки. То есть, липиды смешиваются в бицеллах, как в ж.-к., так и в гелевой фазах, что приводит к появлению общих пиков в спектрах ЯМР. Эффективная критическая температура зависит от содержания POPC и уменьшается с ростом количества липида с ненасыщенной ацильной цепью, что в целом ожидаемо и согласуется с поведением липидных бислоев. Высокое содержание POPC также увеличивает радиус бицелл и ТЗР. Более внимательный взгляд на ^{1}H-спектры таких бицелл позволяет увидеть, что пик от холиновой группы ФХ разделяется на три сигнала ниже критической точки (Рис. 59B). В спектрах как DPPC, так и POPC не наблюдалось более 1 сигнала от холиновой группы при всех условиях. Такое поведение можно объяснить разным окружением холиновых групп, что позволяет измерить коэффициенты диффузии, характеризующие каждый из трех сигналов по отдельности (пики 1, 2 и 3 на рис. 59), и рассчитать гидродинамические радиусы

частиц. Совместный анализ интенсивностей сигналов в спектрах ^{1}H и ^{31}P при 10-20 ºС показал, что общая доля липидов в ж.-к. фазе соответствует интенсивности пика 2 при всех исследованных температурах, что позволяет заключить, что пик 2 - соответствует и DPPC и POPC в ж.-к. фазе. В свою очередь, сигналы 1 и 3 относятся к гелевому состоянию DPPC или POPC. Пик 2 соответствует наименьшему гидродинамическому радиусу, что согласуется с описанным ранее исследованием смеси DPPC/CHAPS - ж.-к. бицеллы имеют меньший размер, чем гелевые в условиях сосуществования фаз бислоя. Интенсивность пика 1 растёт при добавлении POPC, следовательно пик 1 соответствует POPC в гелевой форме, а пик 3 - DPPC. Фазовые переходы не наблюдаются в бицеллах POPC/CHAPS, следовательно наличие пика POPC в гелевой форме подразумевает смешивание липидов в бицеллах в гелевом состоянии ниже точки фазового перехода. Более того, при низких температурах большая часть POPC переходит в гелевую форму: при 10 ºС доля POPC гелевой форме составляет почти 20% от общего числа ФХ в бицеллах, содержащих 20% POPC. Наконец, оба гидродинамических радиуса, соответствующих пикам 1 и 3 в спектре ^{1}H, характеризуют такие смешанные частицы в гелевой форме. Поскольку эти радиусы достоверно и существенно различаются, можно сделать два вывода. Во-первых, радиус бицелл в гелевом состоянии растёт при увеличении содержания POPC. Во-вторых, распределение частиц по содержанию POPC и, следовательно, по размеру оказывается достаточно широким, чтобы разница между средними значениями гидродинамического радиуса для POPC и DPPC достигала 1 нм.

Наблюдение фазовых переходов, позволяет заключить, что POPC и DPPC образуют бицеллы в смесях с CHAPS и перемешаны даже в гелевом состоянии. Однако, ниже точки фазового перехода раствор таких смешанных бицелл оказывается в значительной степени неоднородным. Образуются два типа частиц, при этом бицеллы в гелевом состоянии характеризуются широким распределением по радиусу и по содержанию POPC. Поскольку однородность раствора является одним из необходимых условий проведения исследований пространственной структуры белков при помощи ЯМР, смешанные бицеллы из ФХ с различными ацильными группами, нельзя рассматривать в качестве мембраноподобных сред для нужд ЯМР, только бицеллы с малыми q (0.1-0.3) имеют подходящие характеристики.

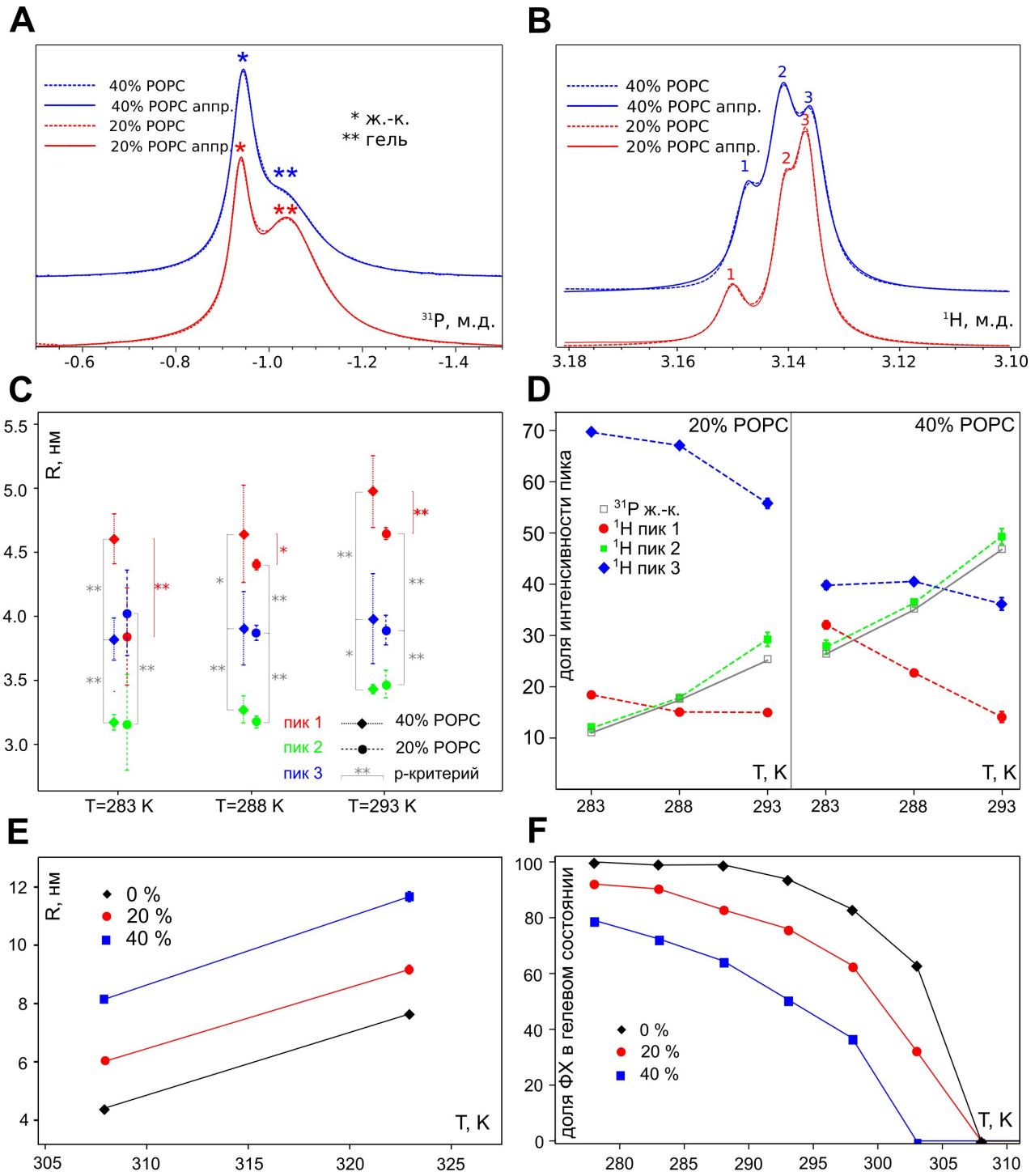

Рисунок 59. A - спектр ^{31}P бицелл POPC/DPPC/CHAPS q=1.5 с содержанием POPC 20 (красным) и 40 (синим) % при 20 ºC. Непрерывной линией показан результат аппроксимации, а пунктирной линией - исходные экспериментальные данные. **B -** регион спектров ^{1}H бицелл POPC/DPPC/CHAPS q=1.5 с содержанием POPC 20 (красным) и 40 (синим) % при 20 ºC. **C -** гидродинамические радиусы, измеренные для сигналов 1, 2 и 3 панели **B** при трех температурах. На рисунке показана достовреность наблюдаемых различий в соответствии с p-критерием. * соответствует $p<0.05$, ** - $p<0.01$. **D -** доля интенсивности пиков 1, 2 и 3 в общем интеграле трех сигналов в спектре ^{1}H, в зависимости от температуры и содержания POPC. **E -** гидродинамические радиусы бицелл POPC/DPPC/CHAPS q=1.5 с содержанием POPC 0 (черным), 20 (красным) и 40 (синим) % при 35 и 50 ºC. **F -** доля ФХ в гелевом состоянии по данным спектроскопии ^{31}P, в зависимости от температуры, в бицеллах POPC/DPPC/CHAPS q=1.5 с содержанием POPC 0 (черным), 20 (красным) и 40 (синим) %.

4.15.6 Смешанные бицеллы ФХ/холестерин.

Холестерин также является одним из важнейших компонентов клеточных мембран животных, и, как известно, меняет параметры упаковки липидов в бислоях. В клеточных мембранах содержание холестерина может достигать 30%, в зависимости от органеллы [447]. При этом, холестерин может взаимодействовать со сфингомиелином и МБ, образуя кластеры с изменёнными свойствами бислоя, которые обычно называют рафтами, а состояние липидов в рафтах - жидко-упорядоченной фазой [181,448]. Многие белки могут специфически взаимодействовать с холестерином, используя так называемые CRAC/CARC мотивы, такое взаимодействие может служить сигналом для миграции белка в рафты клеточной мембраны [435]. Иными словами - холестерин это тот самый компонент мембраны, который регулирует "мозаичность" ее структуры, наличие микродоменов и их состав. Специфические взаимодействия МБ с холестерином в некоторых случаях могут быть чрезвычайно важны для их функционирования. В литературе можно встретить работы, изучающие влияние холестерина на структуру МБ в бицеллах, однако неспецифические эффекты, такие как влияние холестерина на параметры липидного бислоя в изотропных бицеллах, никогда не исследовались [61,133,449]. В текущей работе были приготовлены несколько смесей DMPC/холестерин/CHAPS с q=1.5 и содержанием холестерина от 1 до 7%. Более высокого содержание холестерина достигнуть не удалось, такие бицеллы оказывались нестабильны и со временем происходило образование осадка. Также не удалось изучить влияние холестерина на фазовые переходы в изотропных бицеллах - ниже критической точки DMPC бицеллы становились нестабильны и выпадали в осадок. При этом, выше критической точки наличие холестерина никак не влияло на спектр ^{31}P (Рис. 60). С другой стороны, холестерин оказывал значительное влияние на температурно-зависимый рост частиц. Добавление холестерина постепенно снижает амплитуду эффекта ТЗР, при этом практически не влияя на размер частиц в районе критической точки DMPC (Рис. 61). Эффект был гораздо более выражен в бицеллах POPC/CHAPS. В смеси q=1.6 формировались частицы радиусом 74 нм при 40 ºC, раствор был мутным. В присутствии 5% холестерина радиус уменьшился до 24 нм и далее до 15 нм, когда содержание холестерина достигло 10%, раствор становился прозрачным. При этом эффект нельзя объяснить малым размером молекулы холестерина по сравнению с DMPC или POPC. Если в бицеллах DMPC/CHAPS q=1.5 часть липидов не заменить на холестерин (q=1.4), а просто удалить из смеси, эффект ТЗР все равно оказывается сильнее, чем при замещении липидов холестерином (Рис. 61D).

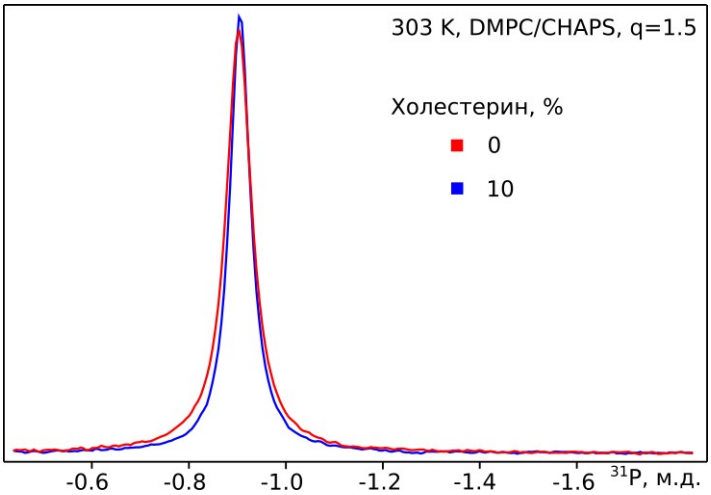

Рисунок 60. Спектр ЯМР ^{31}P образца бицелл DMPC/CHAPS q=1.5 в присутствии и в отсутствие 10% холестерина при 30 ^{o}C.

Одной из основных трудностей при работе с холестерином является низкая растворимость этого липида. Из-за этого преципитация липидов оказывается необратимой, а для приготовления смешанных бицелл необходимо использовать сложную процедуру, включающую этап растворения липидов в хлороформе и длительную сушку. Для приготовления образцов с включением МБ такой протокол неприменим. Поэтому, было бы удобно использовать растворимые аналоги холестерина, такие как гемисукцинат холестерина (ХГС), который часто применяют для стабилизации образцов GPCR [36]. Проведённое исследование показало, что ХГС также влияет на температурный рост бицелл, правда эффект оказывается гораздо слабее, чем у холестерина - 7% последнего эквивалентны 20% ХГС. Влияние ХГС можно объяснить зарядом головной группы, поведение смешанных бицелл DMPC/ХГС схоже с поведением частиц DMPC/DMPG. Однако, в случае холестерина такое объяснение неприемлемо. Влияние холестерина на размер изотропных бицелл можно объяснить изменением упаковки липидного бислоя. Более плотная упаковка липидов в присутствии холестерина, что наблюдается в компьютерных экспериментах [450], должна снизить вероятность слияния бицелл и понизить амплитуду ТЗР. Возможно, образуется некий аналог жидко-упорядоченной фазы бислоя, хотя полученные данные не позволяют сделать однозначный вывод. Тем более, что изменение параметров бислоя под действием холестерина, если и имеет место, никак не отражается в спектрах ^{31}P.

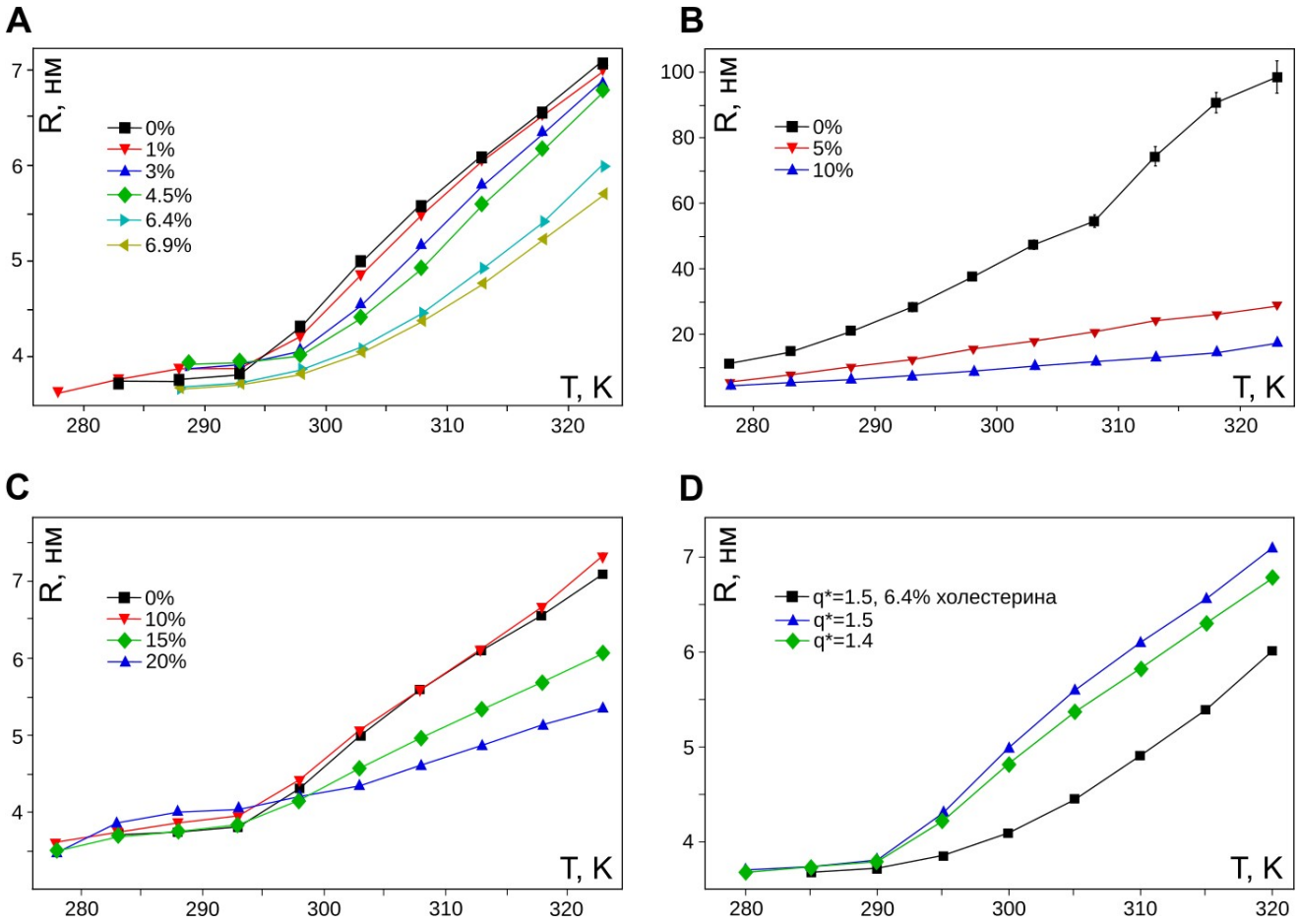

Рисунок 61. **A -** зависимость радиуса бицелл DMPC/CHAPS q=1.5 от температуры при различном содержании холестерина. **B -** зависимость радиуса бицелл POPC/CHAPS q=1.6 от температуры при различном содержании холестерина. **C** - зависимость радиуса бицелл DMPC/ CHAPS q=1.5 от температуры при различном содержании ХГС. **D -** Приведены кривые R(T) для образцов DMPC/CHAPS q=1.5 с 6.4% холестерина и без него (черный и синий цвета соответственно), а также для образца, идентичного образцу с холестерином по содержанию DMPC и CHAPS, но не содержащего холестерина.

В целом, проведённые работы показывают, что применение холестерина в качестве компонента ИБ является достаточно сложным с точки зрения пробоподготовки. Такие образцы необходимо всегда держать при повышенной температуре, что может негативно сказаться на их стабильности. Образование жидко-упорядоченного состояния бислоя, аналогичного наблюдаемому в липидных рафтах, вызывает сомнения. Тем не менее, смешанные бицеллы DMPC/холестерин могут выступать удобной мембраноподобной средой для исследования специфических взаимодействий между МБ и холестерином.

4.16. Заключение

Резюмируя **главу 4**, можно сделать несколько выводов:

1. Удалось разработать методы исследования структуры изотропных бицелл на основе спектроскопии ЯМР, которые опираются на измерение двух параметров - размера частиц в зависимости от q и температуры, концентрации свободного детергента, а также на наблюдение фазовых переходов. С использованием методов были охарактеризованы множество составов бицелл, в том числе с различными липидами, в смесях и по отдельности, и с различными ободообразующими агентами.

2. Для наблюдения фазовых переходов была разработана специальная методика на основе спектроскопии ^{31}P. Это позволило впервые показать, что даже в самых малых частицах происходят фазовые переходы липидов, что раз и навсегда закрывает спор о структуре малых изотропных бицелл - эти частицы действительно содержат участок липидного бислоя. Более того, анализ зависимости параметров фазовых переходов в бицеллах от температуры, состава липидов и состава раствора показывает, что основные черты фазового поведения липидных бислоев воспроизводятся в изотропных бицеллах.

3. Для десятков различных составов были измерены такие параметры как размер частиц и концентрация детергента в мономерной форме. Эти параметры позволяют рационально планировать заранее состав смесей липидов и детергентов, необходимый для проведения исследования структуры МБ, а также контролировать размер частиц при разбавлении/концентрировании, что важно для исследования ассоциации МБ в мембраноподобном окружении. Было показано, что бицеллы радиусом свыше 4 нм могут увеличиваться в размере при нагреве выше критической температуры, что вызвано обратимым слиянием бицелл при соударениях. Данный эффект зависит от типа детергента и липидного состава бицелл, усиливается при наличии липидов с ненасыщенными ацильными группами и заметно ослабляется при наличии в частицах анионных липидов и холестерина.

4. Были изучены параметры бицелл с модельными трансмембранными белками, разработаны методы измерения радиуса частиц с белком на основании кросс-скореллированной релаксации ^{1}H-^{15}N. Предложены модели, описывающие размер частиц с белком и согласующиеся с экспериментальными данными. Было показано, что в зависимости от обод-образущего агента может изменяться стабильность и подвижность ТМ белка, а также параметры взаимодействия белок/липид. При этом, структура ТМ части МБ не изменяется, взаимодействия между ТМ частью белка и детергентом не наблюдаются. С другой стороны,

детергент в составе бицелл может денатурировать внемембранные домены МБ. Для предотвращения такого рода проблем, было предложено использовать сверхмягкие детергенты семейства Façade. Показано, что Façade-EM способен поддерживать водорастворимое состояние и нативную структуру внутриклеточного домена рецептора нейротрофинов p75, в отличие от остальных детергентов, таких как DHPC, CHAPS и Façade-EPC.

5. На основании полученных данных можно сформировать списки компонентов ИБ которые можно использовать для приготовления мембраноподобных сред и компонентов, которых следует избегать. Так, из детергентов, корректное формирование бицелл обеспечивают CHAPS, CHAPSO, DHPC, Façade-EM и Façade-EPC, а применение DH_7PC и холиевой кислоты недопустимо. При этом оптимальным детергентом является CHAPS в силу низкой цены, "мягкости" и низкой смешиваемости с липидом. Среди липидов можно использовать ФХ (за исключением липидов с ненасыщенными цепями), СМ и анионные липиды (ФГ, ФС), но только в смесях с цвиттерионными. Исключается использование ФЭ и бицелл из анионных липидов. Смешанные бицеллы ФХ/холестерин могут применяться при содержании последнего ниже 10%, но с чрезвычайной аккуратностью. В смесях СМ/холестерин изотропные бицеллы воспроизводимо не формируются.

В целом, представленная работа в области изотропных бицелл предоставляет достаточное количество информации, чтобы исследователь смог предсказать все параметры объектов в растворах бицелл при изучении влияния окружения на свойства МБ.

Глава 5. Разработка методов определения структуры димеров мембранных белков

В главе 1 приводится достаточно широкий набор методов, применяемых сегодня для изучения структуры МБ большого размера. Для получения структуры белка используют контакты ЯЭО, химические сдвиги, спиновые зонды и остаточные константы диполь-дипольного взаимодействия, при различных схемах изотопного мечения - от тотально меченых вариантов, до селективно меченых в отдельных положениях аминокислотных остатков. При этом, есть класс белков, требующий особого внимания и разработки специализированных методов их изучения - димерные или олигомерные МБ. Известно, что димеризация может являться необходимым условием активации ряда МБ, в том числе многих клеточных рецепторов с одним трансмембранным сегментом [451]. ТМ домены таких белков являются достаточно небольшими, чтобы их структуру можно было исследовать даже в димерном/олигомерном состоянии с использованием "стандартного" подхода ЯМР - спектроскопии ЯЭО. При этом, если структура мономера белка может быть легко получена напрямую, то для определения интерфейса взаимодействия субъединиц требуются специальные методы. На момент начала работы, в мире была получена всего одна структура димера МБ, принадлежащего к классу битопных белков, гликофорина А [43], при этом никакие особые методы локализации интерфейса взаимодействия не применялись.

5.1. Изотопная фильтрация.

5.1.1. Первая структура димера МБ на основании данных изотопной фильтрации.

Основными проблемами при изучении структуры олигомеров МБ с использованием спектроскопии ЯМР являются (1) определение олигомерной формы белка в образце и (2) измерение межмолекулярных взаимодействий. Несмотря на кажущуюся простоту, определение олигомерной формы белка трудновыполнимо. Чаще всего для этих целей используют либо априорные предположения либо SDS-электрофорез, что может приводить к существенным ошибкам. Так, в работе Endres с соавторами, при изучении структуры ТМ домена EGFR предполагалась димерная форма белка в бицеллах, на основании сведений о поведении полноразмерного рецептора [108], однако впоследствии было показано, что в условиях эксперимента белок находится в мономерном состоянии [452]. Аналогично, в последние несколько лет были опубликованы три структуры тримеров ТМ доменов в бицеллах, во всех

случаях тримерное состояние определялось по данным гель-электрофореза после ресолюбилизации белка в бицеллах, что не подвергалось сомнению, поскольку полноразмерные белки образуют тримеры при активации [110,111, p. 5,112]. Тем не менее, **подвижность белка из образца с бицеллами на форезе определяется не столько его молекулярной массой, сколько количеством молекул SDS в смешанной мицелле DMPC/DHPC/SDS/белок и размером этой мицеллы**. Иными словами, при прочих равных и при большом избытке SDS МБ до и после реконструкции в бицеллах должен иметь одинаковую электрофоретическую подвижность в гелях, поскольку равновесное состояние олигомеризации достигается в течение одной-двух минут. Любые отличия связаны с присутствием в системе смешанных мицелл сложной формы, подвижность агрегатов на форезе не может рассматриваться как метод определения олигомерного состояния. Решению данной проблемы в том числе посвящена глава 6 представленной работы.

Если димеризация/олигомеризация доказана, то встаёт вопрос регистрации межмолекулярных контактов ЯЭО. При образовании симметричных димеров/олигомеров, химические сдвиги ядер различных субъединиц комплекса оказываются неотличимы в силу их эквивалентности. В первой работе в области (MacKenzie et al., [43]) использовался автоматический анализ всех контактов ЯЭО, с идентификацией взаимодействий, которые не могут осуществляться внутри одной субъединицы. Прежде чем начать работу по изучению структуры димерных ТМ доменов, исследование MacKenzie и соавторов по по определению структуры димера гликофорина А в мицеллах DPC было воспроизведено. Как оказалось, методы расчёта пространственной структуры, применяемые в лаборатории ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН, не способны однозначно выявить межмолекулярные контакты, все наблюдаемые кросс-пики в целом удовлетворяют мономерному состоянию белка или могут быть исключены из анализа в силу большой спиновой диффузии - явления, которое приводит к возникновению кросс-пиков ЯЭО между далёкими ядрами, в том случае, если есть путь передачи намагниченности через третье ядро. Спиновая диффузия особенно ярко выражена в МБ в силу большой массы комплекса белок/детергент/липид. При этом, методики расчёта соответствовали "золотому стандарту" ЯМР [453]. Таким образом, ранее существовавшие методы определения структуры димеров МБ связаны с достаточно субъективной процедурой выявления межмолекулярных контактов. В случае гликофорина А (GpA) был предварительно получен значительный объем данных точечного мутагенеза, которые, по-видимому, и применялись в качестве дополнительного источника информации для идентификации межмолекулярных взаимодействий.

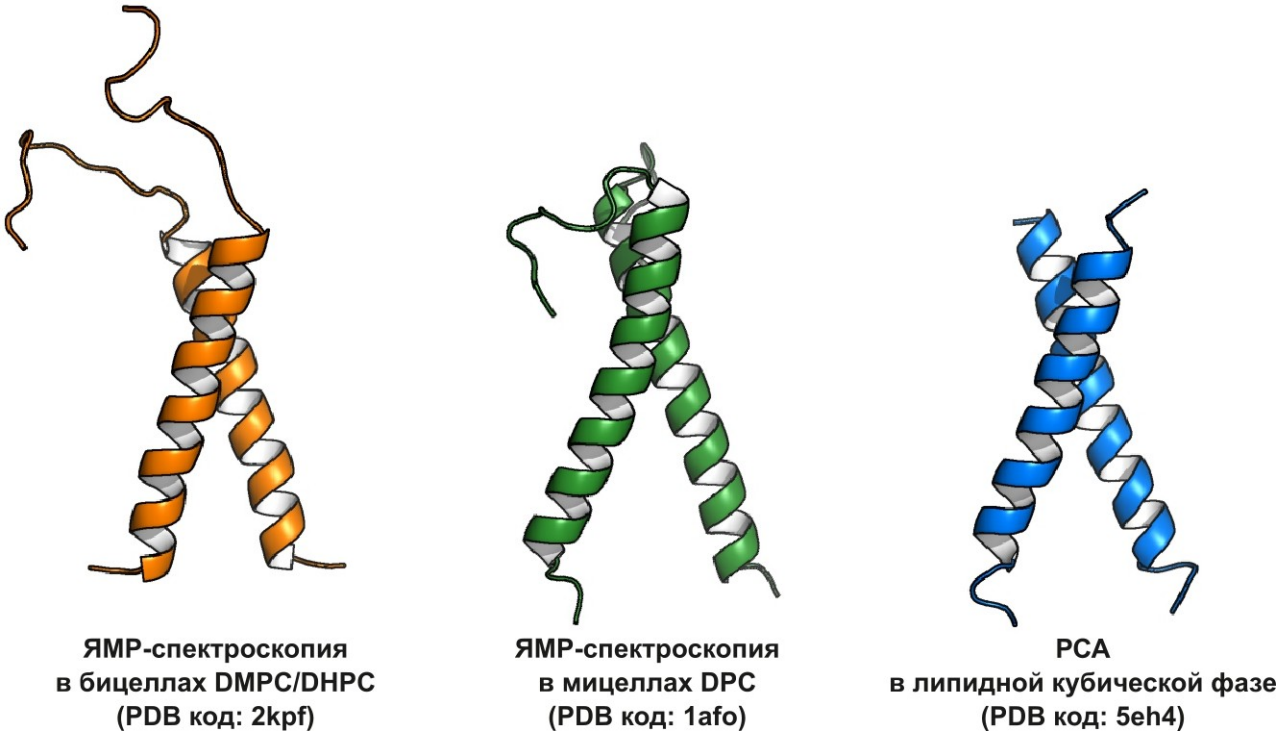

Рисунок 62. Пространственные структуры GpA в различном окружении. Структура 2kpf в бицеллах получена в рамках данной работы.

Поэтому, **Бочаровым Э.В.** было предложено использовать изотопную фильтрацию. Суть метода в том, чтобы получить образец, в котором одновременно присутствуют молекулы белка с различным типом изотопного мечения. При этом половина белка будет образовывать так называемые "изотопные гетеродимеры", в которых две субъединицы имеют разный тип изотопного мечения, например, одна - $^{1}H/^{12}C/^{14}N$, а другая $^{1}H/^{13}C/^{15}N$. Для таких образцов можно предложить эксперимент, в котором сначала уничтожается вся намагниченность у протонов, связанных с $^{13}C/^{15}N$, затем осуществляется перенос намагниченности за счёт ЯЭО, а потом регистрируется намагниченность протонов, связанных с ядрами $^{13}C/^{15}N$ [454]. Таким образом можно напрямую измерить межмолекулярные контакты ЯЭО (расстояния ^{12}CH-$H^{13}C$). Метод был опробован автором работы на примере GpA в мицеллах ДФХ, что позволило получить уточнённую структуру димера белка. Вместо **6** межмолекулярных ограничений, приведённых в работе MacKenzie [43], удалось найти **17** однозначных контактов. Более того, в дальнейшем структура димера GpA была получена в бицеллах DMPC/DHPC на основании **14** межмолекулярных контактов ЯЭО (рис. 62). Это потребовало использования дейтерированных производных липидов и детергентов, в противном случае межмолекулярные контакты ЯЭО белок/липид препятствовали анализу, а интенсивные кросс-пики от метильных групп липида на натуральном содержании ^{13}C являлись источником шума в спектрах NOESY-HSQC. Структуры

оказались чрезвычайно похожи. В 2015 году была опубликована структура димера GpA в липидной кубической фазе, полученная методами рентгеноструктурного анализа [455]. Структура практически полностью совпадала с конформациями GpA в мицеллах и бицеллах. Это позволяет заключить, что при "сильной" и специфичной димеризации параметры структуры димера не зависят от окружения.

5.1.2. Оптимизация метода изотопной фильтрации

Несмотря на то, что предложенный метод позволил получить структуру GpA, вскоре встал вопрос о его оптимизации. Основным компонентом импульсной последовательности является фильтр [460]. Данный элемент использует КССВ $^{1}J_{CH}$ для уничтожения намагниченности ^{1}H-^{13}C. Длительность элемента составляет более 10 мс, во время которых намагниченность протонов находится в поперечной плоскости и подвержена быстрой релаксации, что существенно понижает чувствительность эксперимента. Более того, фильтр неидеален из-за того, что $^{1}J_{CH}$ разнятся, в зависимости от типа группы и могут составлять от 123 Гц в метильных группах до 160-180 Гц в ароматических. Это приводит к так называемой "протечке фильтра" и появлению остаточных внутримолекулярных кросс-пиков в спектре. Чтобы преодолеть проблему были предложены два подхода - (1) оптимизировать импульсную последовательность для фильтрации и (2) отказаться от фильтрации средствами импульсной последовательности, используя взамен другие схемы изотопного мечения.

Второй подход получил распространение за границей. Уже упомянутые ранее работы по изучению тримеров DR5 и FAS [111,112] опирались на регистрацию ЯЭО между NH протонами дейтерированного белка и алифатическими протонами $^{1}H/^{12}C$ меченого, так же, как и работа по определению структуры ковалентного димера белка ζζ [75]. Это позволяет отказаться от фильтрации в импульсной последовательности, ведь в качестве фильтра выступает дейтерирование алифатических протонов одной из субъединиц. Однако, простой анализ показывает, что предложенная схема несовершенна. В первую очередь, амидные протоны являются не самыми удачными ядрами для измерения межмолекулярных расстояний. Так, в пространственной структуре димера ТМ домена HER2 (HER2tm) в мицеллах DPC наблюдается всего 5 метильных групп на расстоянии менее 5 А от амидных протонов второй субъединицы димера, при этом ни одной группы не находится ближе 4 А [461]. С другой стороны, можно найти 6 метильных групп на расстоянии менее 4 А от CαH протонов, из которых 3 находятся ближе 3 А. Это связано с тем, что в α-спиральных белках все амидные протоны участвуют в образовании внутримолекулярных водородных связей и находятся вдалеке от интерфейсов димеризации. Следовательно, несмотря на выигрыш за счёт оптимизации поперечной

релаксации из-за отсутствия фильтра в импульсных последовательностях, амидные протоны находятся в среднем на 1-2 А дальше от интерфейса взаимодействия α-спиралей, чем алифатические протоны белков. Это существенно снижает число контактов, которые можно регистрировать таким образом, а также существенно понижает чувствительность (изменение расстояния с 4.5 до 2.5 А приводит к увеличению интенсивности сигналов в спектрах ЯЭО более чем в 30 раз).

С другой стороны, преимущество в качестве фильтрации за счёт использования дейтерирования также относительно иллюзорно. В первую очередь потому, что достигнуть 100% эффективности изотопного мечения невозможно. Для получения на 97% дейтерированного белка необходимо использовать дейтерированную глюкозу (коммерчески доступны препараты глюкозы с обогащением дейтерием до 97%), 98% D2O, а также все компоненты питательной среды (например, соли) должны быть растворены в 98% D2O. Таким образом, максимально возможное обогащение белка дейтерием составляет 97%, в реальности же степень обогащения будет ещё ниже. Это означает, что интенсивный внутримолекулярный кросс-пик ЯЭО (например H_N-CβH или H_N-CγH_3 (Val) в α-спиралях, 2.5 А) от остаточных 3-5% протонов будет иметь интеграл, сопоставимый с самым мощным межмолекулярным контактом (4-4.5 А), поскольку интенсивность сигнала спадает как шестая степень расстояния между ядрами. Иными словами, фильтры на основе дейтерирования заведомо неидеальны в силу неполного мечения белка.

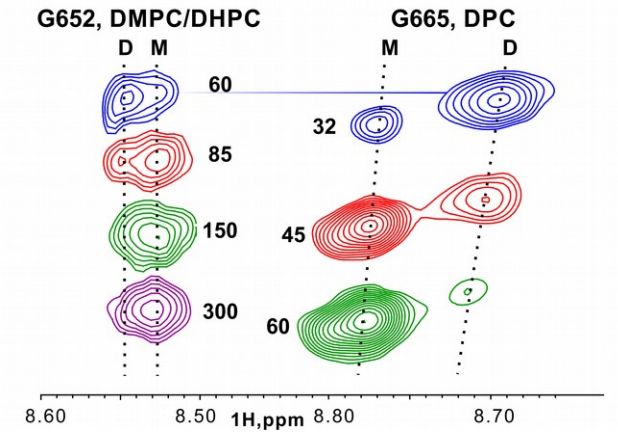

Рисунок 63. Кросс-пики от остатков G652 и G665 в спектрах $^{1}H,^{15}N$-TROSY, полученных для ТМ домена EGFR с примембранным регионом в окружении бицелл DMPC/DHPC q=0.25 (слева) и мицелл DPC (справа), при различных соотношениях LPR. Положение сигналов от димерной и мономерной форм белка указано пунктирными линиями и обозначено как D и M, соответственно.

Это хорошо видно на примере упомянутой работы Endres с соавторами по исследованию пространственной структуры димера ТМ домена белка EGFR [108]. Авторы растворяли белок в бицеллах DMPC/DHPC q=0.25 при соотношении липид/белок 150 и использовали две схемы фильтрации - предложенную в настоящей работе (см. раздел 5.1.1) и вторую схему, с применением дейтерированного образца, селективно протонированного по некоторым метильным группам в смеси с немеченым белком. В результате удалось найти 21 контакт, которые в дальнейшем рассматривались как межмолекулярные. Авторы в тексте статьи заявляли, что часть контактов не удовлетворяли полученной структуре, поэтому были исключены из расчёта на основании данных компьютерного моделирования. Однако, через год работа была воспроизведена автором диссертации - ТМ домен EGFR с примембранным регионом (конструкция, аналогичная использованной Endres et al.) был встроен в мицеллы DPC и бицеллы DMPC/DHPC q=0.25 и были проведены эксперименты по разбавлению белка раствором частиц мембраноподобной среды. Было показано, что и в мицеллах, и в бицеллах наблюдаются медленные переходы димер/мономер, соотношение заселенностей состояний зависит от отношения липид/белок (LPR). При LPR=150 (условия работы Endres et al.) белок находится полностью в мономерном состоянии (Рис. 63). Иными словами, Endres с соавторами интерпретировали мономерное состояние как димерное и из-за "протечки" использованных фильтров принимали остаточные внутримолекулярные сигналы за межмолекулярные. То есть, необходимо всегда исследовать олигомерную форму белка и делать контрольные эксперименты, чтобы избежать неверной интерпретации. В случае гетероядерной фильтрации, контрольным экспериментом может служить идентичный спектр с образца, содержащего только $^{13}C/^{15}N$-меченый белок, без добавления немеченого, или же спектр белка в заведомо мономерной форме. Сигналы, наблюдаемые в данном спектре нужно исключить из списка межмолекулярных взаимодействий или анализировать изменение интенсивностей сигналов, что позволяет расширить число контактов. Например, можно сравнивать между собой интенсивности кросс-пиков в NOESY в спектрах без фильтрации и с фильтрацией, существенное изменение относительной интенсивности сигнала показывает, что пик является межмолекулярным.

Наглядная демонстрация необходимости проведения контрольных экспериментов приведена на рисунке 64. Исследовалась димеризация белка ErbB2/HER2 с внутриклеточным примембранным регионом (HER2tmjm) в мицеллах ДФХ. На рисунке показаны срезы, соответствующие сигналу от метильной группы Cδ1 остатка L664 HER2tmjm, в ^{13}C-фильтрованном спектре NOESY образца димера белка (панель A), мономера белка (панель B) и в обычном спектре NOESY-HSQC димера белка (панель C). В спектре мономерного образца с

фильтрацией наблюдаются сигналы только от амидных протонов (фильтрация по 15N не применялась) и от остаточных протонов дейтерированного детергента DPC, при этом в спектре димерного образца видны множество сигналов, которые можно однозначно рассматривать как межмолекулярные. Важно отметить, что кросс-пики на амидные протоны и на остаточные протоны DPC не видны в стандартном NOESY, то есть межмолекулярные контакты очень слабы и сопоставимы с самыми дальними внутримолекулярными контактами. С другой стороны, кросс-пик остаточных протонов DPC также имеет интенсивность, сопоставимую с контактами белок-белок. При этом, степень дейтерирования DPC составляет 98%, что превышает максимально возможный уровень обогащения рекомбинантных белков данным изотопом. Иными словами, наличие интенсивного кросс-пика от остаточных протонов DPC в спектрах NOESY чётко показывает неэффективность фильтров, основанных на дейтерировании белка.

Дополнительно, фильтрация на основе дейтерирования оказывается чрезвычайно дорогой. Требуется максимальный уровень обогащения, а значит должна использоваться дейтерированная вода (1000 USD за литр) и детйерированная 13C-глюкоза (1800 USD на литр культуры), вместо обычной воды и 13C-глюкозы (800 USD на литр культуры).

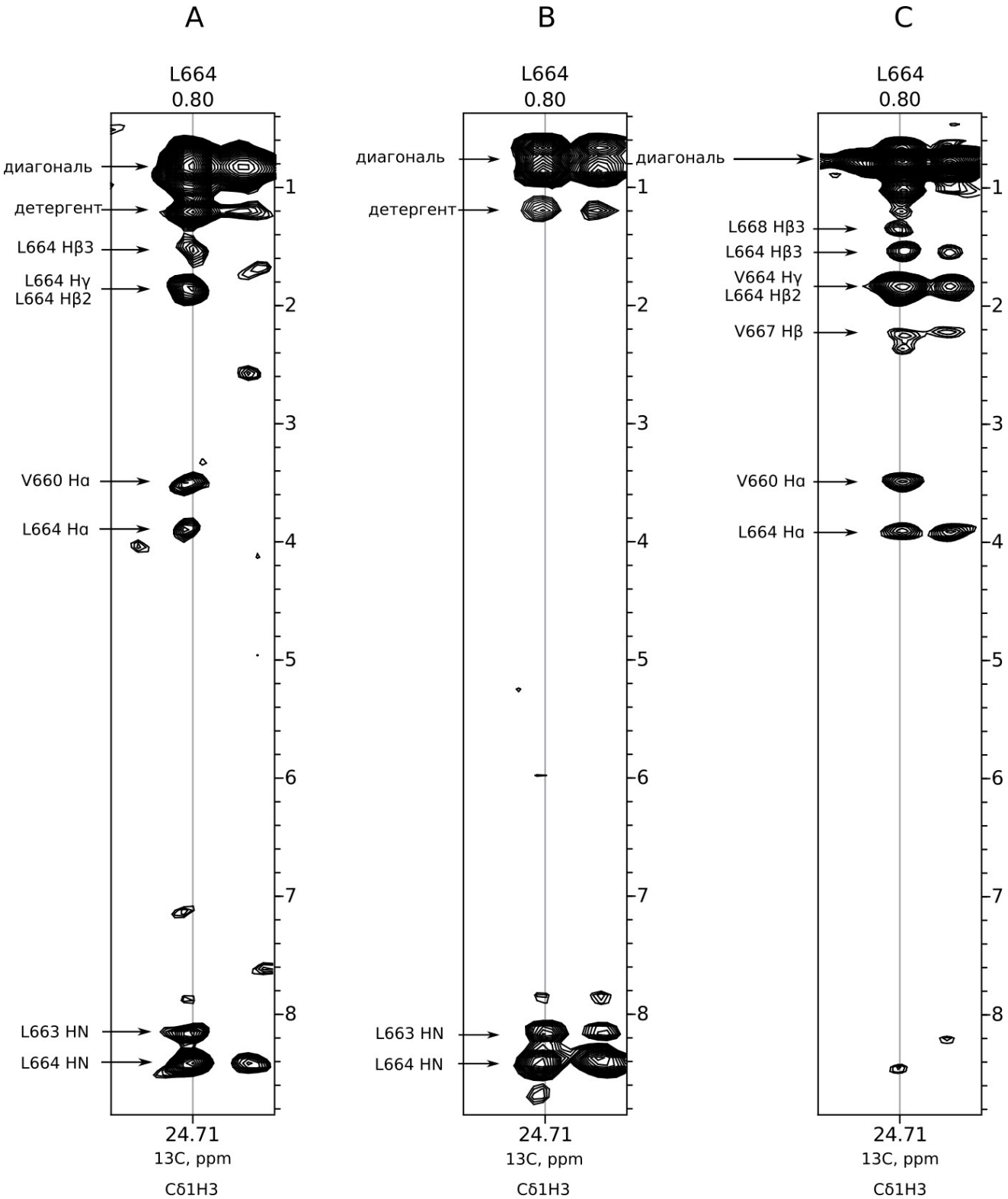

Рисунок 64. Срезы спектров 13C-фильт.-NOESY-HSQC (A,B) и NOESY-HSQC (C) образцов HER2tmjm в мицеллах DPC, зарегистрированных при 40 ºC для образцов димера (A,C) и мономера (B) белка. Срезы соответствуют положению сигнала от метильной группы Cδ1 остатка L664. Отнесение кросс-пиков приведено на рисунке.

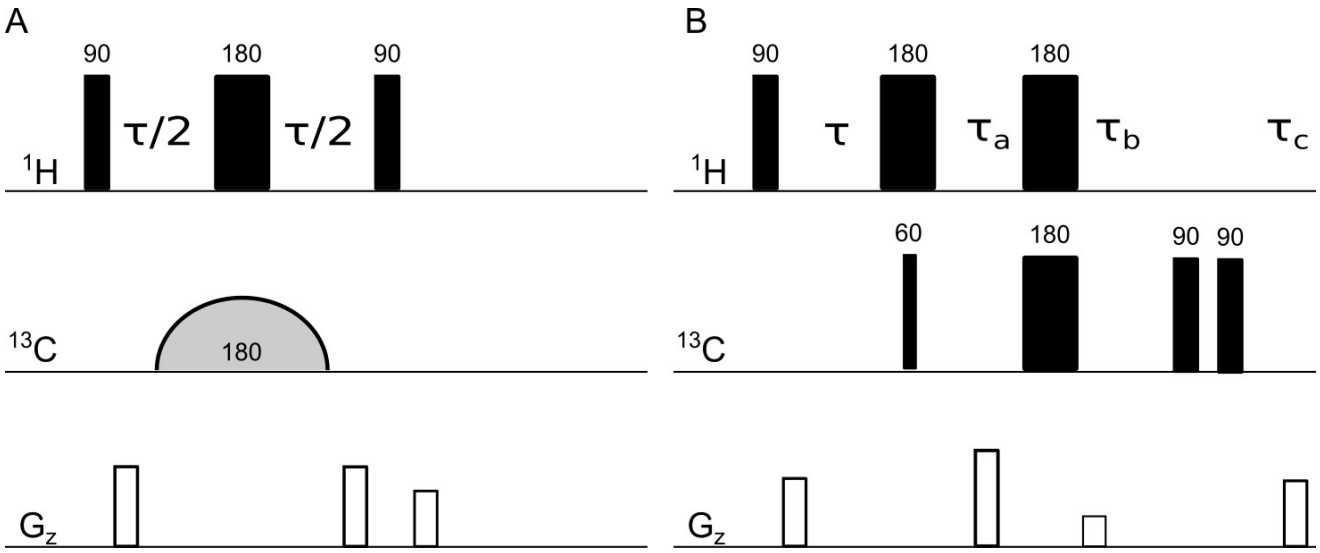

Рисунок 65. Элементы импульсных последовательностей ЯМР для фильтрации по 13С на основе адиабатического импульса [454] (А) и на основе сложного вращения [462] (В). Прямоугольники означают короткие неселективные импульсы на частоте 1Н и 13С. Gz - импульсные градиенты магнитного поля. Серый овал на панели А обозначает адиабатический 180-градусный импульс типа Chirp. $\tau = 1/(2\ {}^1J_{CH})$, $\tau_a = 1.5\ \tau + 0.5\ \tau_c$, $\tau_b = 0.5(\tau - \tau_c)$, длительность τ_c составляет 1 мс.

Однако, даже неэффективность дейтерирования не объясняет 21 межмолекулярный контакт, обнаруженные Endres и соавторами, ведь часть из них получено методом, предложенным в разделе 5.1.1, с применением фильтрации средствами импульсной последовательности. Оставим в стороне эффективность мечения ^{13}C (99%), остаточные сигналы могут возникать в спектрах из-за неэффективности фильтрации. Все фильтры опираются на перенос когерентности благодаря прямой КССВ ${}^1J_{CH}$, при этом используется элемент типа INEPT (Рис. 65). В таких элементах эффективность переноса намагниченности определяется задержкой τ, которая должна быть равна $1/(2\ {}^1J_{CH})$. Поскольку величина константы отличается для различных групп, эффективность фильтра тоже будет разной. Было предложено два варианта решения проблемы "протечки". Во-первых, был разработан фильтр с адиабатическими импульсами (импульсы которые медленно инвертируют намагниченность с развёрткой по химическому сдвигу) [454]. Как оказалось, КССВ ${}^1J_{CH}$ коррелируют с химическим сдвигом ^{13}C, поэтому развёртка импульса по химическому сдвигу при правильно подобранными длительностью и диапазоном частот позволяет получить элемент, в котором для каждого ядра будет своя задержка τ, оптимизированная для КССВ ${}^1J_{CH}$. Если применить два последовательных элемента с адиабатическими импульсами, оптимизированных для различных групп белка, можно добиться почти 100% подавления. В рамках другого подхода используется

композитное вращение - вместо 180-градусного импульса применяется комбинация 60-градусного и 180-градусного импульсов, что позволяет добиться другого профиля эффективности фильтра в зависимости от константы (98% эффективность в диапазоне 120-160 Гц, 99% в диапазоне 130-150 Гц [462]. Два подхода отличаются и по длительности. В первом случае фильтр длится 2τ, 10 мс, во втором 3τ, 15 мс, что значительно понижает чувствительность. Отметим, что именно второй тип фильтрации использовался в работе Endres et al. - с низкой чувствительностью и пониженной эффективностью.

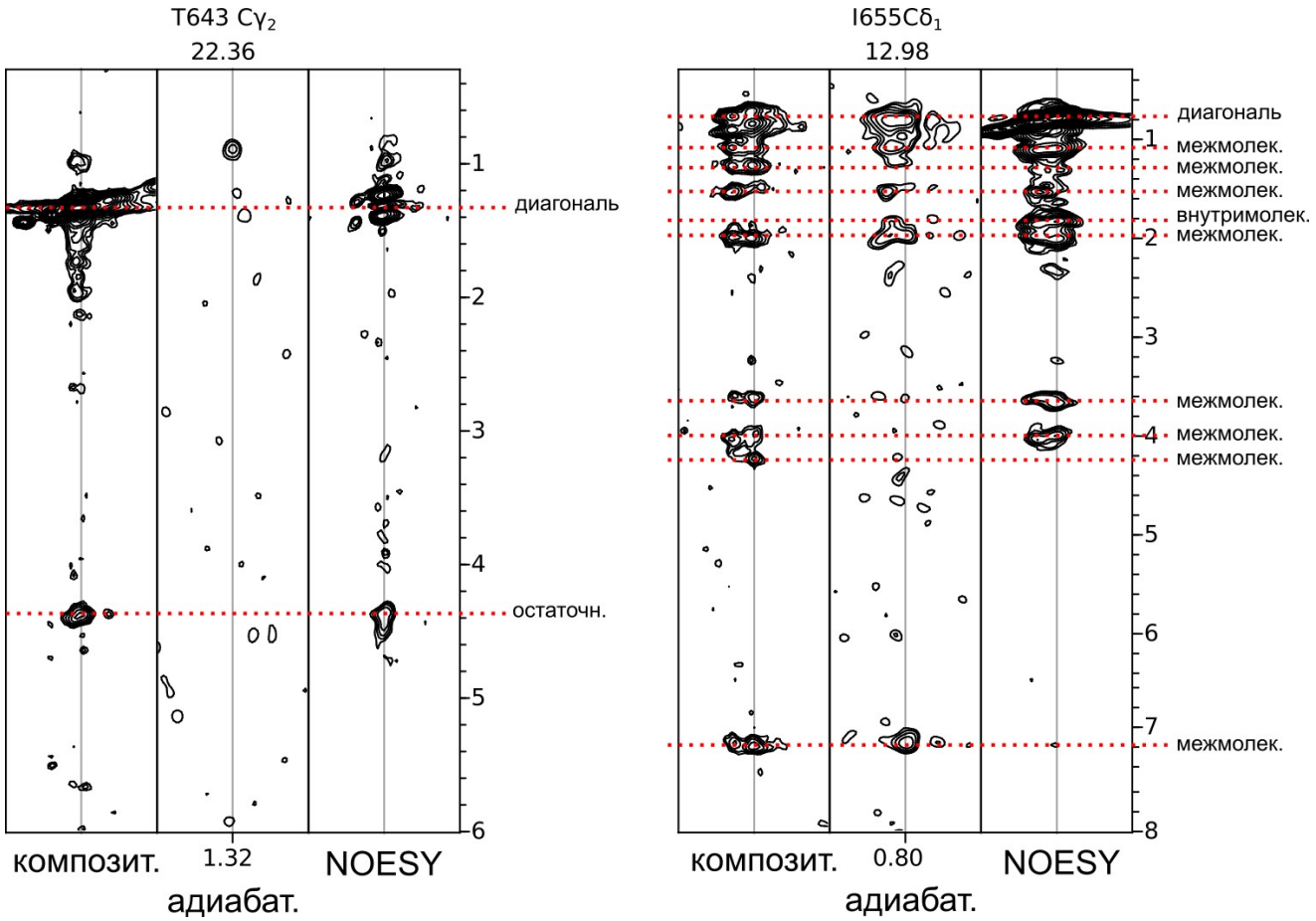

Рисунок 66. Сравнение спектров 3D-^{1}H,^{13}C-NOESY-HSQC HER3tm в мицеллах DPC при 40 ºC. На рисунке показаны двумерные срезы трех спектров: 13C-фильт-^{1}H,^{13}C-NOESY-HSQC с композитным фильтром, ^{13}C-фильт-^{1}H,^{13}C-NOESY-HSQC с адиабатическим фильтром и обчного ^{13}C-фильт-^{1}H,^{13}C-NOESY-HSQC. Срезы соответствуют кросс-пикам от метильных групп Cγ2H_3 Thr643 (в стороне от интерфейса димеризации) и Cδ1H_3 Ile655 (на интерфейсе димеризации). Все спектры получены с одинаковым временем смешивания 80 мс.

Более того, весь анализ эффективности различных фильтров проводился в предположении отсутствия релаксации, которая может значительно искажать результаты экспериментов в случае МБ в мицеллах/бицеллах, когда молекулярный вес комплекса достигает

50 кДа. В этой связи, в настоящей работе было проведено сравнение различных методов фильтрации в применении к ТМ домену белка HER3 (HER3tm) в мицеллах DPC (Рис. 66). оказалось, что оба метода позволяют получить высокий уровень фильтрации, однако, в ряде случаев адиабатический фильтр способен полностью подавить диагональный пик, что упрощает анализ сигналов вблизи диагонали. С другой стороны, при использовании композитного фильтра зачастую наблюдаются остаточные сигналы, как это видно на примере группы $C\gamma_2H_3$ Thr643, которая находится вдалеке от интерфейса димеризации. Таким образом, использование фильтров на основе адиабатических импульсов является предпочтительным.

Приведённые выше размышления позволяют сделать три основных вывода:

1. Необходимо исследовать олигомерную форму белка в условиях эксперимента и доказывать присутствие димерной формы, методами, отличными от спектров NOESY с гетероядерной фильтрацией.

2. Необходимо проводить контрольные эксперименты, чтобы исключить кросс-пики в спектрах NOESY с гетероядерной фильтрацией, которые возникают из-за неполного изотопного мечения или из-за неидеальности импульсных последовательностей. В качестве таких экспериментов предлагается проводить измерения спектров с фильтрацией на образцах, не содержащих немеченого белка или на образцах, заведомо соответствующих мономерному состоянию.

3. Из множества возможных фильтров наиболее оптимальным выглядит фильтрация по ^{13}C с использованием адиабатических импульсов. Фильтрация на основе дейтерирования неэффективна. Финальную детекцию лучше осуществлять по ^{13}C, а не по ^{15}N в силу величины характерных межмолекулярных расстояний между амидными группами одной субъединицы и алифатическими протонами другой субъединицы в димерах α-спиральных белков.

5.1.3. Использование эволюции с постоянным временем и гомоядерной развязки.

Другой важной проблемой, возникающей при изучении структуры димеров α-спиральных белков является неоднозначность отнесения сигналов в спектрах ЯЭО. Основная часть информации об интерфейсе межмолекулярных взаимодействий получается с использованием сигналов от метильных групп белков. При этом α-спиральные МБ содержат множество метильных групп, которые характеризуются низкой дисперсией химических сдвигов. Более того, все кросс-пики по направлению ^{13}C расщеплены на две компоненты из-за сильной КССВ $^1J_{CC}$=35Гц. Это делает отнесение сигналов и анализ спектров NOESY метильных групп

трудновыполнимой задачей. До начала данной работы не предлагалось никаких специальных методов анализа спектров ЯМР МБ, позднее исследователи стали применять особые схемы изотопного мечения с селективным протонированием некоторых CH_3-групп, при которых прямые КССВ $^1J_{CC}$ уничтожались за счёт отсутствия ^{13}C в соседних положениях [463]. Такой подход в целом помогает решить задачу отнесения и анализа спектров ЯМР, однако является чрезвычайно дорогостоящим, стоимость образца белка может превышать 10 000 USD. Поэтому, в целях данной работы было предложено использовать тотально меченные ^{13}C образцы, а для решения проблемы вырожденности спектров было опробованы два подхода: гомоядерная развязка и эволюция с постоянным временем.

Гомоядерная развязка по ^{13}C была разработана еще в конце 1990х годов, после появления импульсов, селективных по диапазону частот [464,465]. Однако, метод не получил широкого распространения, поскольку на тот момент мог применяться исключительно для регистрации спектров CαH-групп (42-70 м.д.), с подавлением двух диапазонов - карбоксильных углеродов (170 м.д.) и CβH некоторых остатков (за исключением Thr, Ser, Leu). В рамках настоящей работы была предпринята попытка вернуться к гомоядерной развязке для регистрации спектров метильных групп с использованием одновременного подавления КССВ по одному диапазону (70-30 м.д.) или по двум диапазонам частот - 70-50 м.д. (Thr, Ala) и 35-25 м.д. (Ile, Val). Однако, использование гомоядерной развязки сталкивается с тремя основными проблемами. Во-первых, возникают "боковые полосы", связанные с модуляцией основной частоты ядра из-за применения периодических импульсов электромагнитного поля. Интенсивность боковых полос напрямую связана с мощностью развязки. Во-вторых, наблюдаются сдвиги Блоха-Зигерта [466], изменение резонансной частоты ядра из-за мощного облучения во время детекции. Сдвиги также зависят от мощности и несущей частоты развязки (Рис. 67). В силу двух перечисленных проблем необходимо искать компромиссную мощность развязки, чтобы добиться достаточно хорошего подавления константы при сохранении приемлемого уровня искажений в спектре. В этой связи, гораздо выгоднее использовать развязку по двум узким диапазонам (требуется меньший уровень мощности), чем по одному широкому диапазону частот. При этом для фильтрации от сигналов вдали от диапазона метильных групп лучше всего подошло применение селективного рефокусирующего импульса ReBURB - этот подход вызывал наименьшее искажение фазы сигналов в получаемых спектрах ЯМР.

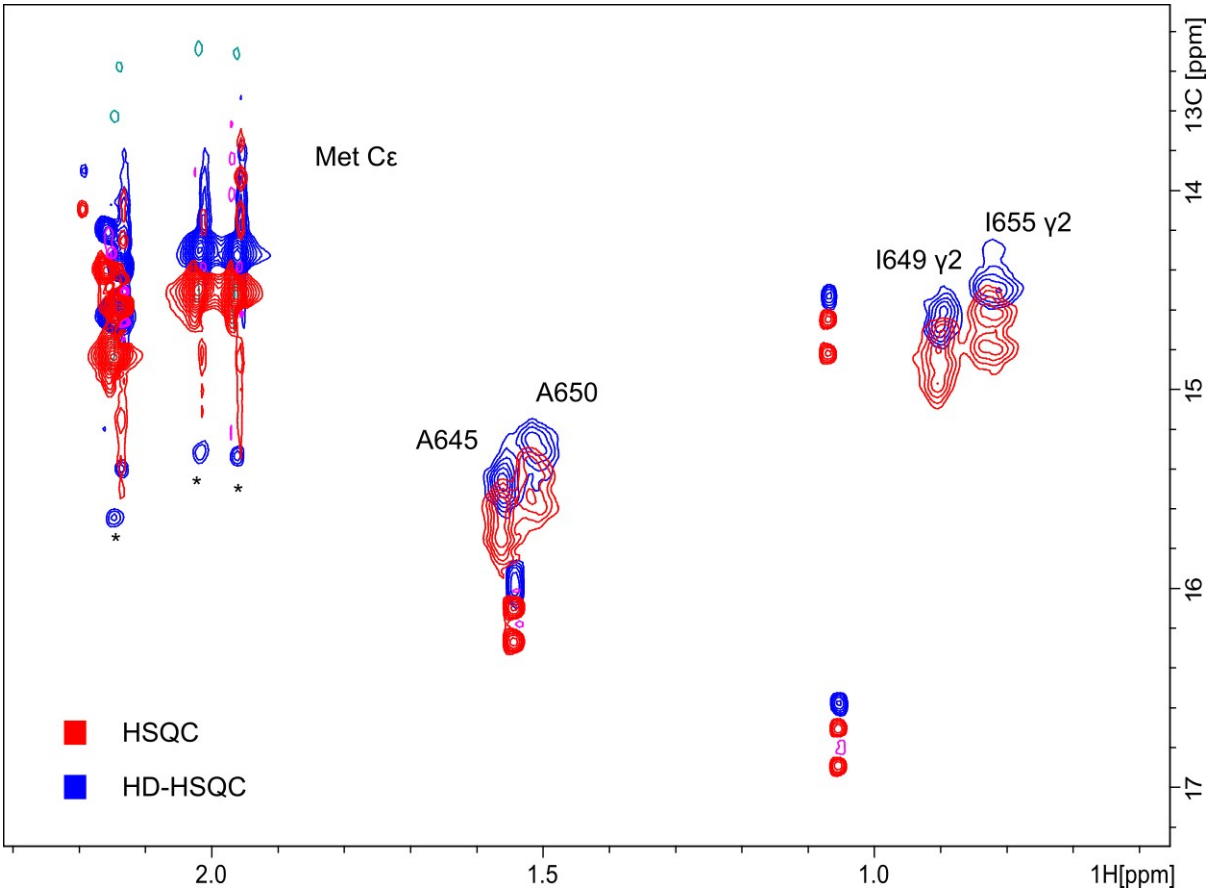

Рисунок 67. Фрагменты спектров 1H,13C-HSQC HER3tm в мицеллах DPC при 45 ºC без (приведен красным) и с гомоядерной развязкой по двум диапазонам частот. Отнесение сигналов метильных групп показано на рисунке, боковые полосы показаны *. некоторые сигналы раздвоены из-за переходов димер/мономер. Спектры получены на спектрометре с рабочей частотой 800 МГц, концентарция белка составляла 1 мМ, эффективное разрешение спектра - 20 Гц.

Наконец, третьей важной проблемой являются близкие химические сдвиги углеродов некоторых метильных групп и углеродов, с которыми наблюдаются КССВ. В первую очередь это касается остатков Leu и Ile. В случае Leu характерный хим. сдвиг ^{13}Cγ 27 м.д., в то время как хим. сдвиги Cδ распределены в диапазоне 26-22 м.д. У Ile, ^{13}Cγ1 - 29-31 м.д., что также близко к положению сигналов метильных групп Leu. Таким образом, практически невозможно подобрать параметры гомоядерной развязки CH_3-групп Leu и Ile, не затронув при этом Cδ Leu. Следовательно, идеального качества развязки для всех метильных групп белка получить невозможно. Для белка HER3tm в мицеллах DPC был проведен статистический анализ эффективности гомоядерной развязки метильных групп. Так, для 16 из 26 групп (все, кроме Cδ Leu) наблюдалось увеличение чувствительности (**1.24±0.09**) с увеличением разрешения спектра (Рис.67). Однако, для всех 10 групп Cδ Leu без исключения наблюдалось падение

интенсивности сигналов (**0.67±0.14**), при заметных искажениях спектра. Таким образом, применение гомоядерной развязки позволяет получить существенный выигрыш в разрешении спектров, 20-30% выигрыш в чувствительности спектров, однако приводит к потерям 30-40% интенсивности сигналов метильных групп остатков Leu, а также к заметному искажению спектров из-за сдвигов Блоха-Зигерта. Тем не менее, выигрыш в разрешении сначала показался важнее частичной потери качества спектров ЯМР, и с использованием гомоядерной развязки были разработаны несколько трехмерных импульсных последовательностей для регистрации спектров ЯЭО/NOESY, что позволило получить отнесение сигналов белков HER3tm и VEGFRtm, а также определить пространственные структуры их гомодимеров в мембраноподобном окружении [467,468].

Однако, в 2011-2013 гг. возникла новая идея - использовать эволюцию с постоянной задержкой для регистрации спектров ЯМР высокого разрешения метильных групп [469]. Накопление стандартных многомерных спектров ЯМР осуществляется за счёт итеративного увеличения длительности специальной задержки (t). В итоге во время t происходит эволюция системы под действием химического сдвига, что позволяет рассматривать t как временное измерение, по которому можно произвести преобразование Фурье и получить спектр ЯМР. Альтернативный подход получил название "постоянная задержка" (англ. constant-time evolution). При таком методе регистрации спектров, изменяется не длительность задержки, а положение 180º импульса, который изначально находится в середине задержки Δ. В первой точке получается идеальное эхо и эволюции системы под действием химического сдвига не возникает. В дальнейшем, при смещении импульса, происходит эволюция матрицы плотности, которую можно описать как $I=I_0\exp[2i\Omega t]$, где t - изменение положения 180º импульса. При этом, 180º импульс в середине задержки не влияет на эволюцию системы под действием КССВ, которая при такой детекции зависит не от t, а от Δ и никак не проявляется в форме сигналов в спектрах. Если правильно подобрать длительность $\Delta=N/{}^1J_{CC}=28.6*N$ мс, можно добиться максимальной интенсивности сигнала при полном отсутствии расщепления за счёт КССВ. Соответственно, подход на основе постоянной задержки имеет ряд преимуществ. Во-первых, он позволяет получить идеальную форму линий в отсутствие релаксации, КССВ и уширения сигналов (Рис. 68). Во-вторых, можно использовать специальные методы линейного предсказания с зеркальным отражением накопленных точек, что приводит к увеличению надёжности алгоритмов линейного предсказания и общего качества спектров. В-третьих, применение постоянной задержки не вызывает никаких искажений, свойственных гомоядерной развязке. Однако, все указанные преимущества уравновешиваются одним, но существенным недостатком

- постоянная задержка 28.6 мс приводит к потере значительной доли сигнала за счёт поперечной релаксации ^{13}C. Именно по этой причине, трудно найти примеры использования постоянной задержки при исследовании структуры небольших водорастворимых белков. С другой стороны, МБ содержат множество метильных групп, которые характеризуются медленной поперечной релаксацией углеродов и большая часть информации о структуре МБ получается именно при детекции CH_3-групп, остальные части спектров ЯМР малоинформативны. Это позволяет рассмотреть детекцию с постоянной задержкой как метод регистрации спектров ЯМР метильных групп для получения максимального разрешения по направлению ^{13}C.

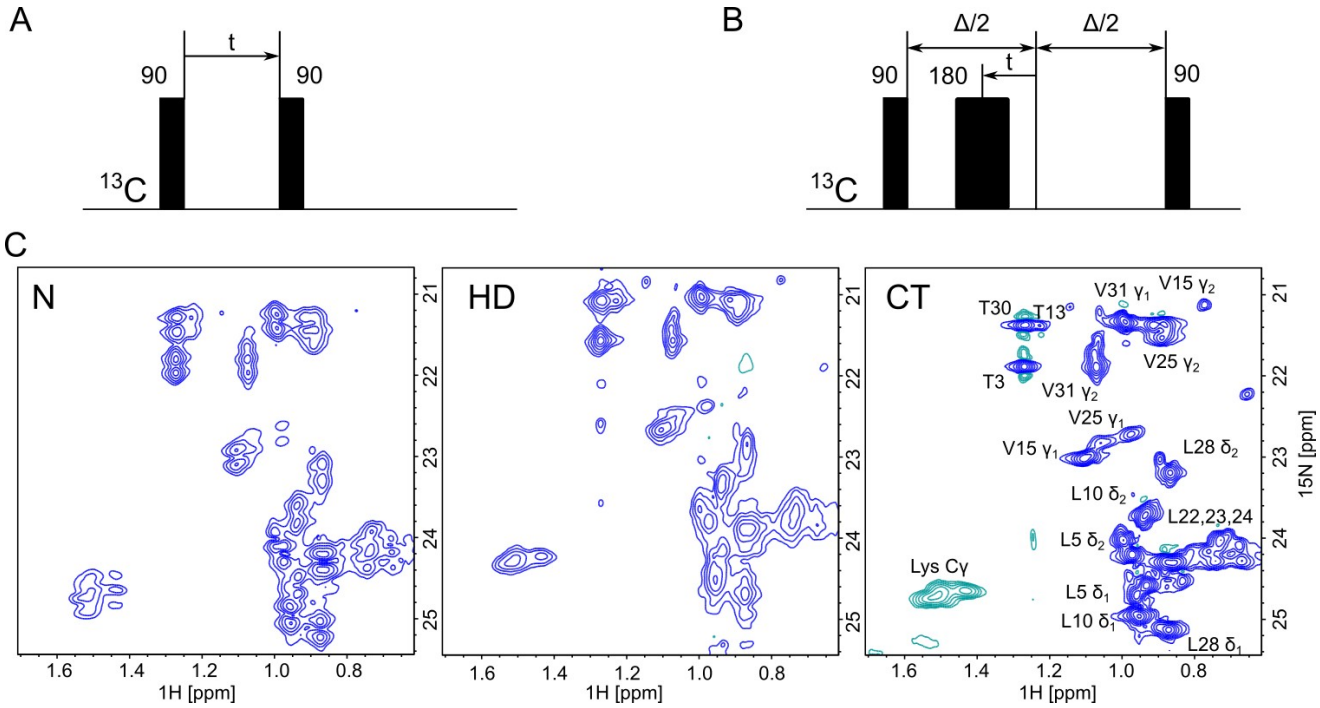

Рисунок 68. A,B - Элементы импульсных последовательностей, применяемые для детекции ^{13}C направлений многномерных спектров ЯМР в стандартных экспериментах (**A**) и с использованием постоянной задержки (**B**). **C** - фрагмент спектров $^{1}H,^{13}C$-HSQC, содержащий сигналы от метильных групп белка VEGFR2tm в мицеллах DPC. Спектры накоплены обычным образом (N), с использованием гомоядерной развязки (HD) и с использованием постоянной задержки (CT). Некоторые сигналы раздвоены из-за равновесия мономер/димер/тример. Спектры получены при 45 ºC, на спектрометре с рабочей частотой 800 МГц.

Для проверки применимости подхода был проведён анализ интенсивностей трёх различных спектров ^{13}C-HSQC МБ (ТМ домен VEGFR2, VEGFR2tm, в мицеллах DPC), примеры спектров показаны на Рис. 68. Все эксперименты были выполнены с одинаковым максимальным временем эволюции по непрямому направлению, для одного и того же образца в идентичных условиях. Как видно, для всех сигналов эволюция с постоянной задержкой позволяет получить улучшенное качество спектров (разрешение, форма линий, наличие искажений). Искажения

наблюдаются только для метильных групп Thr, в связи с узким диапазоном захвата 180º-импульса по ^{13}C вдали от несущей частоты. Эти искажения можно исправить небольшой оптимизацией эксперимента. Что касается чувствительности, то для метильных групп Cδ1 Ile и Cγ Val наблюдаются небольшие потери (до 5%), потери достигают 17% и 27% в случае Cβ Ala, по сравнению со спектром на основе гомоядерной развязки. При этом для метильных групп Cδ Leu наблюдается выигрыш, в среднем 73%. Если взять все 29 сигналов димерного состояния VEGFR2tm, то в среднем использование постоянной эволюции приносит выигрыш 19%, по сравнению с гомоядерной развязкой, при этом качество спектра оказывается несоизмеримо выше. Очевидно, что чувствительность спектра в случае постоянной задержки будет сильно зависеть от скорости поперечной релаксации ^{13}C, поэтому методика не может рассматриваться как универсальная для всех МБ. Однако, для МБ содержащих 2-4 ТМ α-спирали при 40-45 ºC в мицеллах, HSQC с постоянной задержкой является оптимальным методом детекции метильных групп.

В этой связи, были разработаны новые импульсные последовательности для всех экспериментов на основе ^{13}C-HSQC с постоянной задержкой, в том числе NOESY-CT-HSQC, ^{13}C-фильт.-NOESY-CT-HSQC. С использованием данных экспериментов можно получить точное отнесение всех спектров NOESY, в том числе с гетероядерной фильтрацией и анализировать изменения химических сдвигов при переходах димер/мономер. Такой подход применялся для исследования пространственной структуры ТМ доменов TLR3, TLR4, VEGFR2, p75NTR а также ТМ доменов EGFR, HER2 с примембранными регионами в мицеллах DPC. Спектр ^{13}C-фильт.-NOESY-CT-HSQC был впервые применен в 2017 г. для получения сверх-точной структуры ТМ домена HER2 в мицеллах (HER2tm, 13 межмолекулярных кросс-пиков ЯЭО с однозначным отнесением, Рис. 69.).

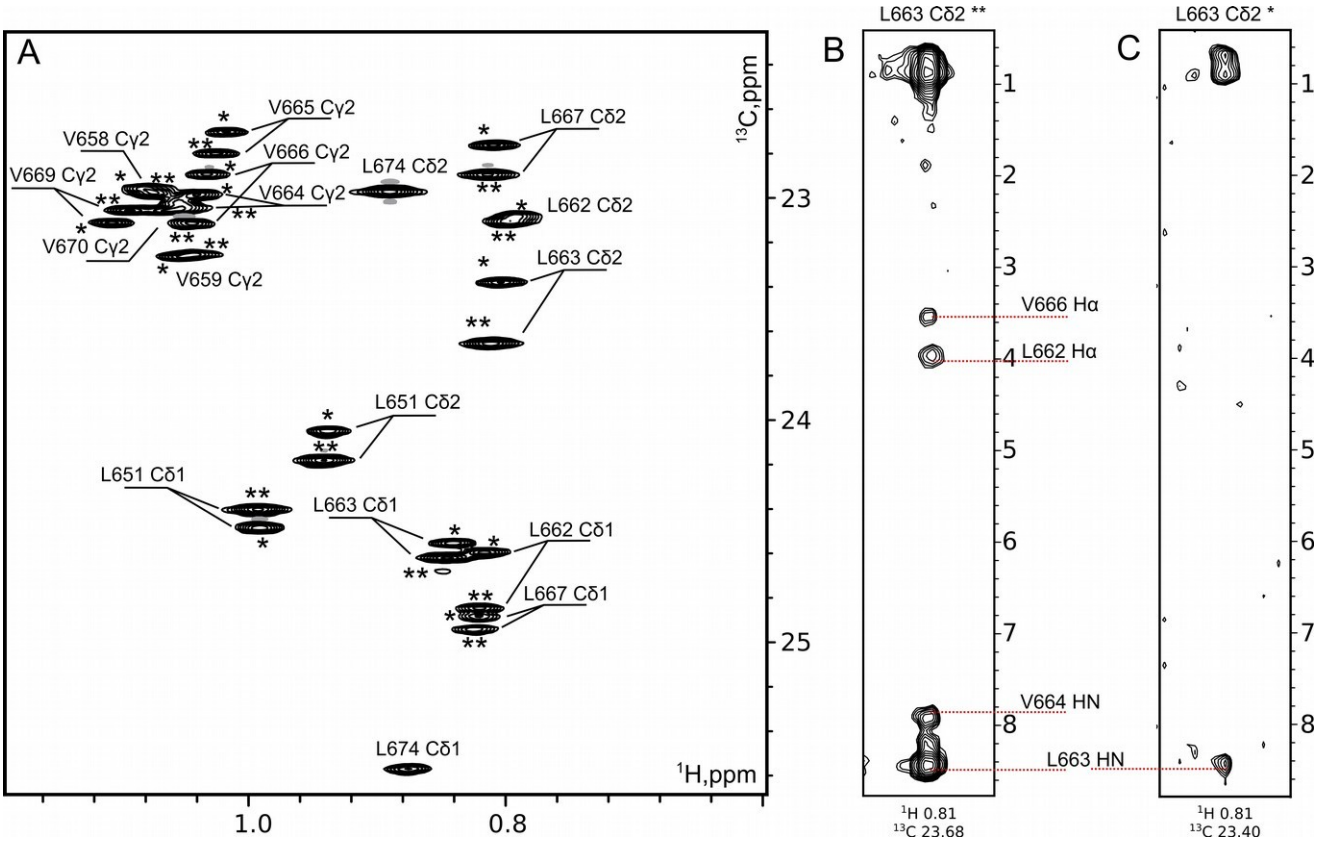

Рисунок 69. А - фрагмент спектра $^{1}H,^{13}C$-CT-HSQC (задержка 113.2 мс) HER2tm в мицеллах DPC, полученного при 45 ºC, LPR=40. Показано отнесение сигналов кросс-пиков в спектре, * обозначает пики от мономера, ** - пики от димера HER2tm, отнесение получено с использованием спектров на основе CT-HSQC. **В -** двумерные срезы трехмерного спектра ^{13}C-фильт.-NOESY-CT-HSQC, соответствующие кросс-пикам от метильной группы $C\delta_2$ L663 мономерного (справа) и димерного (слева) состояния белка.

5.2. Картирование изменений химических сдвигов и параметров подвижности.

Описанные выше методы на основе гетероядерной фильтрации сильно зависят от концентрации белка в требуемой олигомерной форме. В ряде случаев оказывается невозможным достигнуть большого количества белка в необходимом состоянии из-за его склонности образовывать олигомеры высокого порядка. В отсутствие прямой информации в виде кросс-пиков ЯЭО в спектрах NOESY с гетероядерной фильтрацией, в таких случаях требуются дополнительные методы локализации интерфейсов димеризации МБ. Для растворимых белков в таких случаях обычно используют изменения химических сдвигов амидных групп. Находят остатки, для которых наблюдаются наибольшие пертурбации химических сдвигов, а затем методами докинга с ограничениями строят модель комплекса двух белков или белка с

низкомолекулярным соединением [470]. Схожие подходы использовались и для МБ - например, для изучения взаимодействия между белком VDAC1 и холестерином [315]. Однако, поверхность МБ богата метильными группами, именно такие группы являются основными участниками взаимодействий в мембране, поэтому можно ожидать, что изменения параметров метильных групп окажутся лучшими сенсорами межмолекулярных взаимодействий. Более того, описанные выше подходы на основе эволюции с постоянной задержкой позволяют с высокой точностью измерять различные параметры CH_3-групп, соответствующие различным олигомерным формам объекта исследования. Таким образом, в качестве одной из задач работы было определить наиболее надёжные сенсоры межмолекулярного взаимодействия и разработать методику предсказания структуры димеров МБ на основе вызванных димеризацией изменений измеряемых при помощи ЯМР параметров метильных групп белков.

Поставленную задачу можно разделить на две части - оценку предсказательной силы различных параметров и разработку методики предсказания структуры. Для решения первой проблемы необходимо предложить методику оценки предсказательной силы параметров. Анализ литературы показывает, что есть не так много серьезных работ, посвящённых решению подобной задачи в растворимых белках [428], однако многие подходы, предложенные в статье Schumann с соавторами можно использовать и для целей настоящей работы.

В первую очередь, необходимо задать набор пространственных структур, для которого будут проведены измерения. Для данных целей было решено выбрать наиболее качественные структуры. Во-первых это структура димера HER2tm в мицеллах DPC на основе 13 кросс-пиков ЯЭО. Взаимодействие белков осуществляется по неполярному мотиву $V^{658}V^{659}xxL^{662}L^{663}xxV^{666}L^{667}xxxV^{670}F^{671}xxL^{674}$. В спектрах наблюдаются два набора сигналов, соответствующие димерной и мономерной форме белка, получено 100% отнесения. Вторая структура - димер EGFRtm в мицеллах DPC на основе 10 контактов, получена Бочаровым Э.В., Лесовым Д.М. и Пустоваловой Ю.А. [471]. Взаимодействия между α-спиралями происходит по так называемому "гликофориновому" мотиву типа GxxxG ($M^{650}xxxL^{654}xxL^{657}L^{658}xx\underline{\mathbf{A}}^{661}L^{662}xx\underline{\mathbf{G}}^{665}L^{666}xxR^{669}$), при этом переходы димер-мономер медленные, наблюдаются два набора сигналов, получено 100% отнесения. Наконец, третья модель - структура димера HER2tm в бицеллах DMPC/DHPC, так же на основе 10 межмолекулярных контактов. В отличие от мицелл, в бицеллах взаимодействие α-спиралей происходит по "гликофориновому" мотиву ($\underline{\mathbf{S}}^{653}I^{654}x\underline{\mathbf{S}}^{656}\underline{\mathbf{A}}^{657}xV^{659}\underline{\mathbf{G}}^{660}I^{661}xL^{663}V^{664}xxL^{667}xxxF^{671}$), мотив содержит сравнительно мало метильных групп, переходы димер-мономер быстрые, наблюдается один набор сигналов в спектрах. Таким образом, набор структур содержит различные конформации,

полученные в разном мембраноподобном окружении для двух белков. Две структуры соответствуют одному и тому же белку в различном окружении. Рассматриваются процессы быстрого и медленного конформационного обмена. Для всех трёх объектов отнесение сигналов метильных групп было получено с использованием CT-HSQC с высокой точностью и не вызывает сомнений.

Теперь, когда задан набор структур, следует определить подход, который будет использоваться для оценки предсказательной силы различных величин. В первую очередь, все метильные группы белка классифицируются на два типа, на основании доли площади доступной поверхности группы на интерфейсе димеризации. Группы с площадью менее 10% относились к типу C0, в то время как остальные включались в тип C1 и считались участниками процесса димеризации. Затем для всех групп измерялись изменения различных параметров, происходящие при димеризации белка. Для каждого из параметров найденные изменения аппроксимировались нормальным распределением, и для каждого распределения находились два пороговых значения, равные σ (среднеквадратичное отклонение) и 2σ. Группы, для которых величина изменения параметра превосходила пороговое значение рассматривались как выбросы распределения и кандидаты в участники интерфейса димеризации. Такой подход позволяет избежать субъективных критериев поиска "выбросов" и рассматривать различные измеряемые величины ЯМР единообразно. Таким образом для каждого из параметров можно сформировать несколько наборов метильных или других групп белка: (1) точные положительные предсказания (TP) - "выбросы распределения", которые входят в группу C1; (2) ложно-положительные предсказания (FP) - "выбросы распределения", которые не входят в группу C1; точные отрицательные предсказания (TN) и ложно-отрицательные предсказания (FN). Далее, для каждой из величин можно рассчитать положительную предсказательную силу (PPV) и чувствительность (S) при различных пороговых значениях.

$$S=N(TP)/N(C1) \quad (17)$$

$$PPV=N(TP)/N(TP+FP) \quad (18)$$

Таким образом PPV описывает надёжность предсказания, а S - количество найденных остатков. Очевидно, что максимизировать нужно обе величины, однако PPV видится более важной. Можно предложить считать надёжными предсказания с PPV свыше 0.67, когда количество верно предсказанных остатков в два раза превышает число ошибочных предсказаний. Что касается чувствительности, можно предложить величину 0.5 как критерий достаточности, однако допустимые рамки величины S необходимо определить

экспериментально. Ниже представлены результаты анализа изменений различных величин с применением предложенного подхода.

5.2.1. Химические сдвиги ^{15}NH.

Из анализа химических сдвигов был исключён белок HER2tm в бицеллах, поскольку для него не наблюдалось двух наборов сигналов, мономерное и димерное состояние белка достигались за счёт замыкания/размыкания межмолекулярной дисульфидной связи остатка C642 при большом избытке бицелл, остаток находится в N-концевом подвижном участке. Из-за этого измеренные пертурбации химических сдвигов могут включать неспецифическую часть, возникающую не вследствие димеризации. Для HER2tm и EGFRtm в мицеллах наблюдаются медленные переходы, чётко видны два набора сигналов (Рис. 69A), изменения химических сдвигов можно оценить, используя один эксперимент/образец. В первую очередь был проведён анализ химических сдвигов амидных групп, именно этот параметр чаще всего используется для картирования сайтов межмолекулярных взаимодействий для растворимых белков. В качестве меры изменения использовался "обобщенный химический сдвиг" - длина вектора изменения положения сигнала в спектре HSQC, выраженная в Гц и приведённая к м.д. по направлению ^{1}H. Как оказалось, химические сдвиги NH не могут использоваться для предсказания интерфейсов димеризации: PPV параметра 0.23(0) при пороговом значении σ (2σ) для EGFR и 0.27(0.5) для HER2 (Рис. 70). 0.23 и 0.27 в целом соответствуют доле остатков C1 из общего числа аминокислот белка (0.23 и 0.19) и, следовательно, мат. ожиданию для случайного распределения. Иными словами, любой анализ, основанный на химических сдвигах амидных групп выдаст больше ложно-положительных результатов, чем точных предсказаний. Этого можно было ожидать, поскольку химические сдвиги амидных протонов, которые меняются сильнее всего при димеризации, в первую очередь зависят от длины водородных связей, в которых они участвуют [340]. С учетом того, что амидные группы в α-спиральных МБ удалены от интерфейса взаимодействия, основной вклад в изменения химических сдвигов этих групп вносят слабые изменения структуры ТМ α-спиралей (наблюдаемые изменения можно получить удлинением/укорачиванием водородных связей основной цепи менее чем на 0.01 A). Таким образом, следует избегать использования химических сдвигов основной цепи α-спиральных МБ при анализе межмолекулярных взаимодействий.

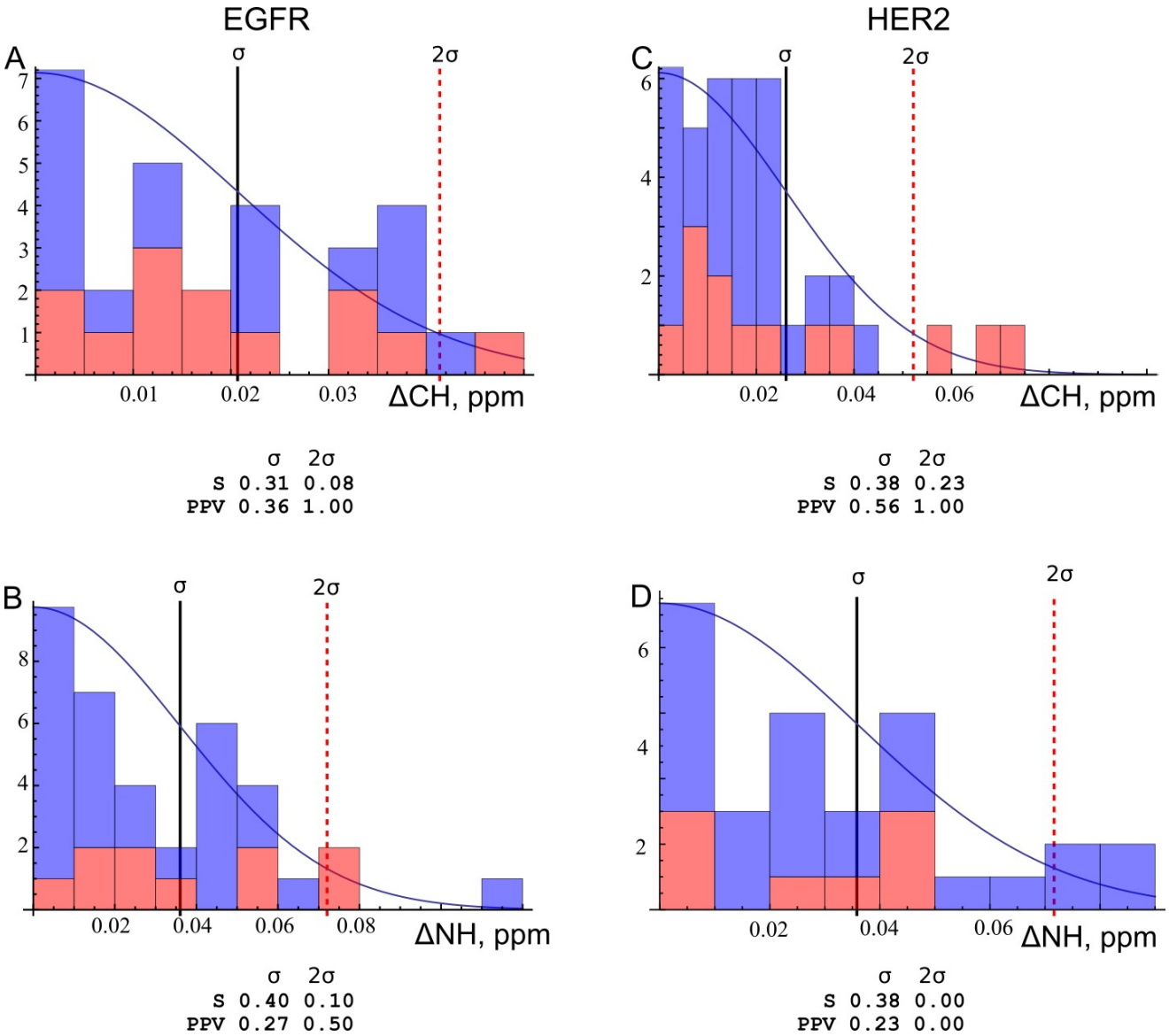

Рисунок 70. Распределения изменений обобщенного химического сдвига метильных (A,C) и амидных (B,D) групп EGFRtm (A,B) и HER2tm (C,D) в мицеллах DPC. Красные прямоугольники соответствуют группам/остаткам на интерфейсе димеризации (C1). Пороговые величины σ и 2σ показаны черной и пунктирной красной линиями. Под графиками приведены рассчитанные значения PPV и S.

5.2.2. Химические сдвиги ^{13}CH

Ситуация обстоит несколько лучше при анализе изменений химических сдвигов метильных групп, которые непосредственно участвуют в межмолекулярном взаимодействии, образуя плотные контакты на интерфейсах димеризации. Для HER2tm в мицеллах хим. сдвиги метильных групп позволяют получить PPV 0.56 (1.0) для отсечки σ (2σ), однако чувствительность при 2σ сравнительно мала - всего 0.23, что позволяет найти только три

остатка на интерфейсе димеризации с наиболее плотным взаимодействием. Совершенно другая картина наблюдается для EGFR. PPV составляет 0.36 при отсечке σ, что соответствует случайному распределению. При отсечке 2σ можно получить PPV=1 при очень низкой чувствительности - предсказывается всего один аминокислотный остаток интерфейса димеризации. Вероятно, что ошибочность предсказаний, полученных по изменениям хим. сдвигов метильных групп для EGFR связано с аллостерическими контактами между группами в длинной полилейционовой последовательностью. Таким образом, из двух изученных белков, в одном случае изменение положений сигналов CH_3-групп белка однозначно коррелирует с интерфейсом димеризации, тогда как в другом случае - нет. Следовательно, этот параметр необходимо использовать с осторожностью - при высоком пороговом значении изменения (2σ) и применяя дополнительные методы анализа, например, поиск периодичности изменений с шагом 3-4 а.о. (шаг α-спирали).

5.2.3. КССВ C-C/N

Из-за низкой предсказательной способности химических сдвигов предлагается рассмотреть другие параметры метильных групп. Например, применение эволюции с постоянной задержки позволяет измерять вицинальные гетероядерные КССВ Cγ [230], которые зависят от двугранного угла χ_1 боковых цепей остатков Val, Ile, Thr. Логично ожидать, что при димеризации конформация боковых цепей изменится, что приведет к различиям в КССВ мономерного и дмерного состояния белка. Применимость этого параметра была изучена на примере HER2tm в бицеллах DPC. Этот белок был доступен в чрезвычайно высокой концентрации (2.5 мМ), поэтому оказалось возможно провести измерения КССВ с использованием дифференциального спин-эха в спектрах на основе CT-HSQC с задержкой на эволюцию 114 мс. Такая длительность задержки позволяет получить КССВ с ошибкой не более 0.1 Гц. В результате удалось измерить 11 КССВ $^3J_{C\gamma C}$, столько же констант $^3J_{C\gamma N}$ и 8 КССВ $^3J_{C\delta C\alpha}$ для каждого из состояний белка. Несмотря на высокую точность, не удалось обнаружить ни одной боковой цепи, для которой изменение КССВ превышало бы ошибку измерения. Иными словами, при димеризации ТМ доменов не происходит значительных пертурбаций конформаций боковых цепей, КССВ не могут использоваться для определения интерфейсов взаимодействия между МБ.

5.2.4 Параметры подвижности метильных групп

Другими измеряемыми величинами в спектрах ЯМР метильных групп являются параметры релаксации. Релаксация ^{13}C в целом редко используется в современной ЯМР-

спектроскопии, однако, можно ожидать, что даже если конформация боковой цепи а.о. существенно не меняется, изменение картины взаимодействий при димеризации должно повлечь за собой модификацию подвижности метильных групп. При этом сами по себе параметры ЯМР-релаксации вряд ли можно использовать для поиска поверхностей взаимодействия между МБ, поскольку они зависят от общей подвижности белка, которая очевидно должна также меняться при димеризации. Однако, можно конвертировать параметры релаксации в характеристики подвижности, такие как скорость вращения метильной группы вокруг связи C-C' (τ_i), а также параметр порядка связи C-C' ($S^2_{C'C}$) [472–474]. Подход для измерения параметров ЯМР-релаксации ядер ^{13}C, а также метод их преобразования в параметры подвижности метильных групп был предложен Лесовым Д.М. Для всех трех объектов тестового набора были проведены измерения двух параметров - кросс-корреляции Γ_2 и скорости продольной релаксации R_1 метильных групп и был проведен анализ изменений рассчитаных значений τ_i и $S^2_{C'C}$ на интерфейсах димеризации.

Предсказательная сила $S^2_{C'C}$ оказалась невысокой и лишь незначительно превышала математическое ожидание для случайной величины. С другой стороны, свойства τ_i оказались на высоте (Рис. 71). PPV для всех трёх структур было достаточно высоким уже на отсечке 1σ: 0.80 для HER2tm в мицеллах, 0.67 для HER2tm в бицеллах и 0.67 для EGFRtm в мицеллах. Чувствительность также оказалась значительной: 0.62, 0.52 и 0.47, соответственно. Более того, в отличие от химических сдвигов, измерение τ_i позволяет получить от 5 до 7 остатков на интерфейсе, что должно быть в теории достаточно для определения угла скрещивания ТМ спиралей. Таким образом, из всех изученных вариантов только скорость вращения метильной группы вокруг связи CC' оказалась надёжным параметром, с высоком потенциалом успешного использования для предсказания поверхностей межмолекулярного взаимодействия. Это можно объяснить способностью предложенного подхода разделять эффекты, связанные с плотной упаковкой на интерфейсе и связанные с изменением конформации. $S^2_{C'C}$ - это эффективный параметр, который описывает вращение вокруг нескольких связей, следовательно изменения $S^2_{C'C}$ требуют изменений конформации боковых цепей нескольких остатков. С другой стороны, τ_i описывает вращение вокруг единственной связи и не так сильно зависит от окружения.

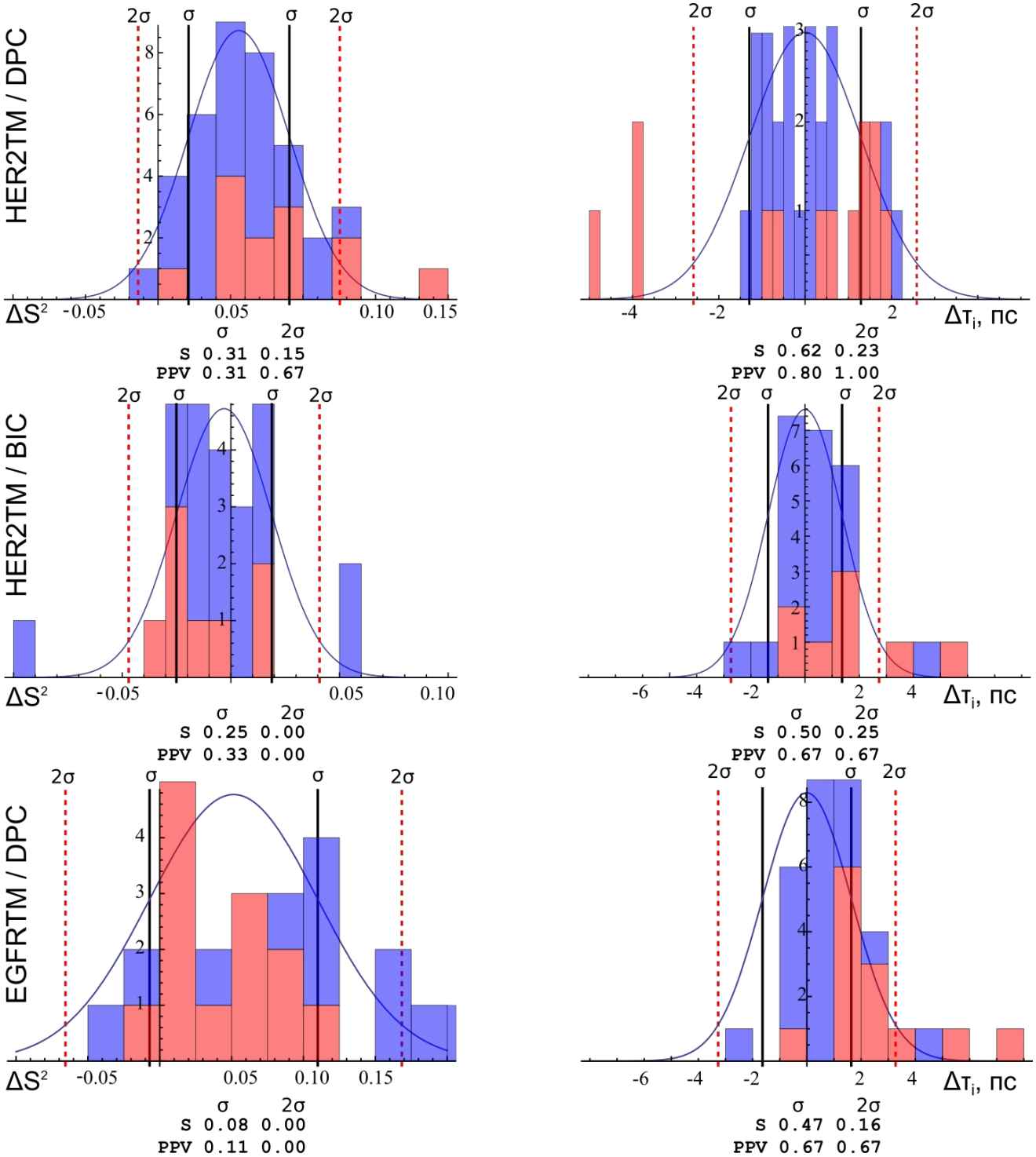

Рисунок 71. Распределения изменений параметра порядка связи CC' ($S^2_{CC'}$) и скоростей вращения метильных групп (τ_i) при димеризации HER2tm в мицеллах DPC, бицеллах DMPC/ DHPC q=0.3 и EGFRtm в мицеллах DPC. Красные прямоугольники соответствуют группам/остаткам на интерфейсе димеризации (C1). Пороговые величины σ и 2σ показаны черной и пунктирной красной линиями. Под графиками приведены рассчитанные значения PPV и S.

5.2.5. Предсказание пространственных структур димеров ТМ доменов на основании изменений измеряемых величин.

До сих пор обсуждалась обратная задача - по имеющейся структуре белка определить предсказательную силу изменений различных параметров, происходящих при димеризации ТМ доменов. Однако, при проведении исследования задача будет сформулирована иначе, необходимо построить модель структуры димера ТМ домена на основании имеющегося набора пертурбаций различных измеряемых величин. Наиболее рациональным подходом кажется использование докинга с последующим выбором окончательной конформации по максимуму некоей оценочной функции. В свою очередь, такая функция должна учитывать совпадение остатков на интерфейсе димеризации модели с выходным набором после статистического анализа пертурбаций τ_i. В настоящий момент разработано несколько программных продуктов для генерации набора различных состояний димеров ТМД, на основе полуэмпирических потенциалов или других параметров структур, в том числе - TMDOCK, PREDDIMER, EFDOCK-TM [477–479]. Из представленного набора наиболее оптимальным выглядит использование TMDOCK, поскольку данный подход является наиболее современным, в сети интернет есть удобный сервер для облачных вычислений и, в соответствии с оригинальной публикацией, программа воспроизводит все структуры, полученные для димеров ТМ α-спиралей к 2017 году [477]. Предсказания основаны на нескольких типов потенциалов - сольватационного, полярных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий, π-стекинга и др. Поскольку анализ корреляций между параметрами метильных групп в димерах и наблюдаемыми изменениями τ_i не выявляет статистически достоверных зависимостей, мы не можем построить количественную штрафную функцию. Поэтому, предлагается использовать двоичную логику, аналогичную методу измерения предсказательной силы различных параметров. Если группа, полученная анализом изменений τ_i, вовлечена в димеризацию в модели, для которой проводится оценка, то добавляется одно "очко" в оценочную функцию, а в конце выбирается модель с наибольшей величиной оценочной функции. Поскольку чувствительность предсказания никогда не превышает 0.55, никакие штрафы за то, что группа на интерфейсе димеризации не присутствует в списке предсказанных групп, не использовались. Участие группы/остатка в димеризации оценивалась по площади поверхности доступной растворителю на интерфейсе взаимодействия. Результаты анализа приведены в таблицах 8 и 9 и на рис. 72.

Как можно увидеть, получены две структуры с одной и той же оценкой для EGFRtm, обе характеризуются С-концевой димеризацией, но разным способом упаковки α-спиралей, правой

и левой закруткой димера. Стоит отметить, что структура ЯМР получила точно такую же оценку, как и две модели TMDOCK, при этом она немного отличается от модели 1 углом скрещивания ТМ α-спиралей. В случае HER2tm в бицеллах, две модели с наивысшей оценкой оказались практически верными. Структура ЯМР была оценена выше, но отличия можно считать незначительными. С другой стороны, модель №1 получила наивысшую оценку по данным, полученным в мицеллах, при этом данная модель далека от реальной конформации. При этом структура ЯМР получает значительно более высокую оценку, однако отсутствует в изначальном наборе. То есть, структура ЯМР была бы однозначно выбрана, если бы схожая конформация была в выводе TMDOCK. Как можно видеть из таблицы 9, дополнение набора TMDOCK экспериментально полученными структурами позволяет сделать однозначный вывод о надёжности предсказаний. Во всех случаях, структуры, определённые по данным ЯМР, получили наивысшую оценку.

Таблица 8. Параметры и оценки по изменению τ_i метильных групп различных моделей димера EGFRtm и структуры ЯМР в мицелах DPC.

№ Модели	**Θ*, º**	**d****	**Оценка**
1	-42	6.4	5
2	18	9.2	5
3	-48	7	3
4	-62	6.9	2
5	-48	6.2	1
ЯМР	-25	6.8	5

* Угол скрещивания спиралей

**наименьшее расстояние между осями спиралей

Таблица 9 . Параметры и оценки по изменению τ_i метильных групп различных моделей HER2TM и структур ЯМР в мицеллах DPC и бицеллах DMPC/DHPC.

№ Модели	**Θ, º**	**d**	**Оценка* (миц/биц)**
1	-20	7.6	4/3
2	-48	6.7	2/3
3	-45	5.6	2/1
4	-54	7.9	1/1
5	-33	8.7	1/1
ЯМР мицеллы	-56	9.1	6/4
ЯМР бицеллы	-47	7.6	3/4

Таким образом, метод предсказания структуры димеров ТМД с использованием докинга и оценочной функции работает в том случае, если искомая конформация присутствует в наборе оцениваемых моделей, при этом иногда можно получить несколько вариантов из которых в дальнейшем понадобится сделать выбор на основании других косвенных данных. Зачастую метод не позволяет выбрать между различными углами скрещивания спиралей при той же локализации интерфейса, особенно если набор получаемых остатков оказывается сравнительно небольшим. Тогда, окончательный выбор модели можно сделать на основании независимой информации, например о том, что при взаимодействии по мотивам типа GxxxG ТМ α-спирали образуют правосторонний димер [480,481].

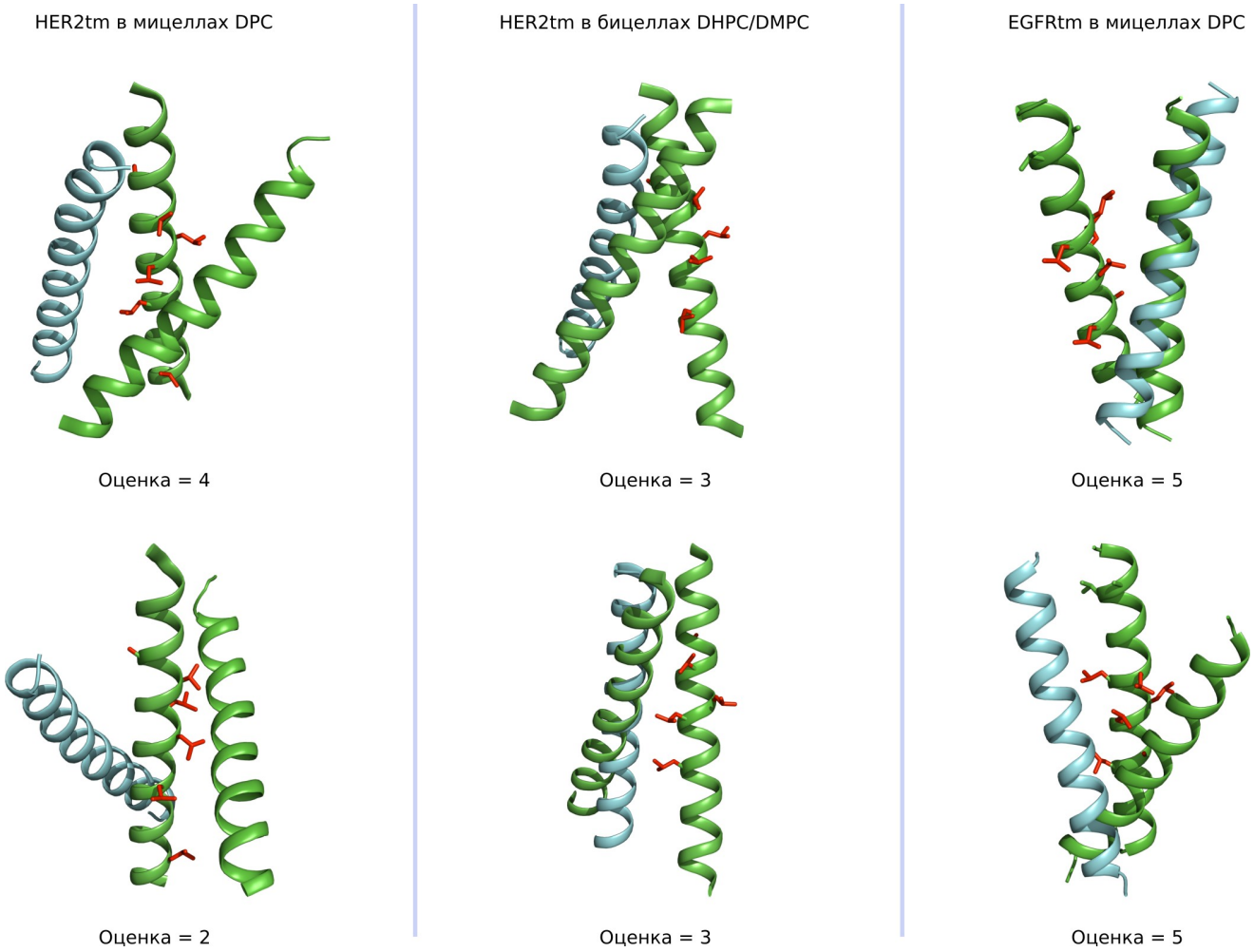

Рисунок 72. Суперпозиция структур ЯМР (зелёным) и моделей TMDOCK с наивысшей оценкой по изменениям скоростей вращения метильных групп (голубым). Структуры совмещены по атомам основной цепи одной из α-спиралей, поэтому одна из спиралей не видна. Боковые цепи остатков, полученных при анализе пертурбаций τ_i, показаны красными цилиндрами.

Резюмируя раздел 5.2, можно заключить, что был разработан подход для предсказания структуры димеров ТМ спиралей на основании изменения параметров метильных групп. Подход применим как в мицеллах, так и в бицеллах, а также для различных скоростей процесса димеризации. Наивысшей предсказательной силой в отношении интерфейсов димеризации обладает скорость вращения метильной группы вокруг связи CC, τ_i, при этом химические сдвиги амидных протонов совершенно неприменимы для картирования взаимодействий между ТМД. Предлагаемый подход может использоваться в том случае, если невозможно непосредственное измерение расстояний между атомами методом гетероядерной фильтрации.

5.3. Практическое применение методик для определения структур димеров МБ.

Как уже неоднократно упоминалось на момент начала работы была известна всего одна пространственная структура димера ТМ α-спиралей - структура GpA в мицеллах DPC. При этом, гликофорин А - удобный модельный объект, поскольку белок способен формировать устойчивые димеры, которые сохраняются даже в присутствии жёстких детергентов. С другой стороны, исследование структуры данного белка не преследует никакой научной цели, биологическая функция димеризации неизвестна, полученная структура не объясняет никаких биологических явлений. В рамках представленной диссертации новые методики, разработанные для изучения димеров ТМ доменов клеточных рецепторов, были применены для исследования структуры ТМД представителей семейств рецепторных тирозинкиназ (РТК) и толл-подобных рецепторов (TLR).

5.3.1. Структуры димерных ТМ доменов РТК.

Описание семейства РТК приводится в главе 3. Данные белки являются рецепторами факторов роста/дифференцировки и миграции клеток. Про многие белки семейства, в том числе HER, FGFR, VEGFR, Trk известно, что они работают по механизму СВ, то есть способны образовывать активную и неактивную димерную форму, переключение между которыми запускает внутриклеточный каскад передачи сигнала. Таким образом, одной их основных задач, которые ставились при разработке методик, являлось определение структур димеров ТМ доменов различных РТК для нахождения двух конформаций ТМД, соответствующих различным функциональным состояниям рецептора. На момент начала данной работы, информация о структуре ТМ доменов РТК отсутствовала, первая в мире структура димера ТМ домена РТК (HER2 в бицеллах DMPC/DHPC) была определена в рамках работы совместно с **Бочаровым Э.В.** и опубликована в марте 2008 г. [458]. В дальнейшем, методы на основе гетероядерной фильтрации неоднократно и успешно применялись автором работы и другими сотрудниками ИБХ РАН (**Бочаровым Э.В., Лесовым Д.М**. и др). Так, в 2010 г. была опубликована первая в мире структура гетеродимера ТМ доменов РТК (EGFR/HER2 в бицеллах) [482], в 2011 - структура гомодимера ТМД HER3 в мицеллах DPC [467], в 2012 - HER4 в бицеллах [483], в 2016 г. была представлена структура гомодимеров ТМД EGFR в мицеллах DPC [471]. Таким образом был получен практический полный набор пространственных структур белков семейства EGFR/HER в различных мембраноподобных окружениях. Предпринимались попытки дополнить этот набор структурами гетеродимеров HER2/HER4 и HER2/HER3, которые, к сожалению, не принесли успеха. Для каждого из исследуемых белков в условиях эксперимента

наблюдалось единственное димерное состояние ТМД, однако, в 2017 году были получены альтернативные состояния гомодимеров EGFR (в бицеллах) и HER2 (в мицеллах DPC) [461,484]. Изменения структуры были вызваны сменой типа мембраноподобного окружения. В результате, впервые удалось найти два состояния димера одного и того же ТМ домена РТК. Параллельно велись работы с ТМ доменами других РТК. Автором были получены структуры димера ТМ домена VEGFR2, а также его двух мутантных форм. Было показано, что мутации, которые вызывают активацию полноразмерного рецептора или конструкции с удаленным внеклеточным доменом приводят к изменению параметров упаковки димера ТМД. Другими сотрудниками ИБХ РАН были получены структуры димеров ТМД рецепторов EphA1 [459], EphA2 [485], FGFR3 [71], GHR [486]. Таким образом, с применением разработанных методов в лаборатории биомолекулярной ЯМР спектроскопии ИБХ РАН были получены 14 пространственных структур димерных ТМД РТК (Рисунок 73). При этом девять структур получены лично автором работы или с его непосредственным участием. Для четырёх белков удалось найти два альтернативных состояния: в случае EGFR и HER2 конформация димера изменялась при переходе между различными мембраноподобными средами, в случае VEGFR2 - за счёт точечных мутаций, в случае GHR две конформации одновременно сосуществовали в растворе.

Анализ полученных структур позволяет выделить два кластера конформаций. В первом кластере взаимодействие между α-спиралями осуществляется в основном в N-концевой области, интерфейс димеризации короткий, оси спиралей скрещиваются под большим углом 40-50º с образованием правой закрутки димера. При этом С-концы ТМ спиралей оказываются на большом расстоянии, а N-концы на малом, что позволило отнести данный тип упаковки димера к активному состоянию рецепторов. Это подтверждается анализом положения известных точечных мутаций в ТМД, которые приводят к спонтанной лиганд-независимой активации рецепторов [360]. Второй кластер структур характеризуется протяжённым интерфейсом взаимодействия спиралей, малым углом скрещивания 10-20º. При этом, сближены оказываются как N-концы, так и С-концы ТМД. Можно предположить, что состояния такого типа соответствуют неактивной димерной форме рецепторов, что противоречит ряду гипотез, высказанных ранее.

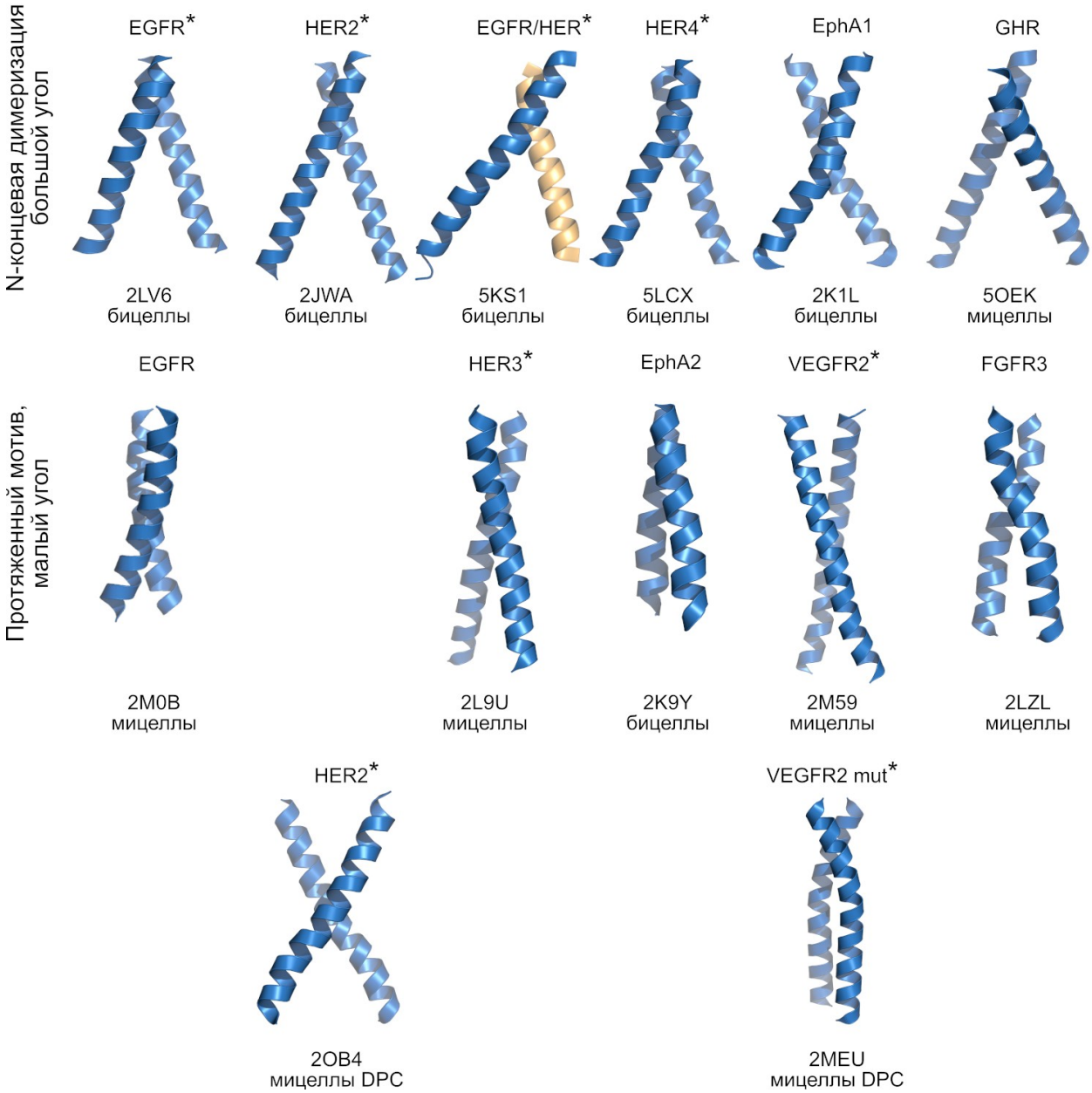

Рисунок 73. Полученные с использованием представленных в работе методик пространственные структуры димеров ТМД различных РТК. Структуры сгруппированы на основании типа упаковки димера. Приведены коды доступа базы данных PDB и тип мембраноподобного окружения.

Активное и неактивное состояния рецепторов должны отличаться расстоянием между внеклеточными доменами (связывание с лигандом приводит к взаимодействию внеклеточных доменов [487]). Соответственно, логичным кажется предположение, что конформации димеров ТМД в активной и неактивной формах также должны отличаться расстоянием между N-концами ТМ спиралей. Однако, за исключением структуры димера ТМД HER2 в мицеллах, ни одной конформации с большим расстоянием между N-концами ТМ спиралей найдено не было.

Очевидно, что в то время как дистанция между С-концами ТМД управляет активностью киназных доменов, состояния ТМД переключаются не за счёт натяжения внеклеточных примембранных регионов.

С другой стороны, можно наблюдать интересную закономерность - 5 из 6 структур первого кластера образуются в бицеллах DMPC/DHPC, при том, что большая часть структур второго кластера формируются в мицеллах DPC. При том, что структура GpA не зависит от типа мембраноподобной среды, в случае РТК наблюдается управление состоянием димернов ТМД свойствами липидного окружения. Более того, замыкание дисульфидной связи вблизи N-конца ТМ домена, что в теории должно имитировать связывание лиганда и димеризацию внеклеточных доменов, не приводит к изменению структуры димеров ТМД. Эти наблюдения, основанные на структурах ТМД РТК в различном окружении, позволили автору работы и **Бочарову Э.В.** высказать гипотезу о липид-опосредованном механизме активации РТК, который объясняет механику переключения ТМД между неактивным состоянием из кластера 2 и активным состоянием из кластера 1 [488]. Согласно гипотезе, переключение между состояниями ТМД происходит за счет изменения свойств липидного окружения, которое, в свою очередь, возникает вследствие перемены характера взаимодействий внеклеточного домена с мембраной при связывании лиганда.

Очевидна и непосредственная научная ценность полученных структур. Димеры ТМД РТК предоставили широкий набор конформаций пар взаимодействующих α-спиралей, что необходимо для изучения основополагающих принципов фолдинга α-спиральных МБ. Например, полученные структуры однозначно показали, что значимость так называемых "гликофориновых мотивов" существенно переоценивается. Первые работы, посвящённые поиску "движущих сил" спираль-спирального взаимодействия в МБ выявили характерные мотивы аминокислотной последовательности, по которым происходит димеризация [364]. Мотивы имеют вид SxxxS, где S - остаток с малой боковой цепью (G,A,S), а x - произвольная аминокислота. Впоследствии, структура гликофорина А в мицеллах показала, что при взаимодействии по такому мотиву могут возникать неканонические водородные связи, которые стабилизируют димер [489–492], а сам мотив был назван гликофориновым. Высказывались предположения, что эффективность мотива объясняется образованием "ложбины" на поверхности спиралей, что делает форму поверхности комплементарной, позволяя более плотную упаковку боковых цепей [385]. С другой стороны, гликофориновые мотивы сравнительно полярны, поэтому была выдвинута гипотеза о "липофобном эффекте" - аналогично гидрофобному эффекту в воде, в мембране состояние липидов может быть

невыгодным с точки зрения как энтропии, так и энтальпии системы, что может приводить к стремлению белка "экранировать" невыгодные части поверхности посредством димеризации. Со временем, стало считаться, что наличие гликофоринового мотива в последовательности ТМ спирали с чрезвычайно высокой вероятностью обеспечивает димеризацию по соответствующему интерфейсу.

Однако, как показали полученные в настоящей работе структуры РТК второго кластера, гликофориновые мотивы далеко не гарантируют образования стабильных ассоциатов ТМД. Во-первых, многие димеры, где взаимодействие спиралей осуществлялось по гликофориновым мотивам оказались достаточно слабыми, практически весь белок переходил в мономерную форму, когда на одну молекулу ТМД приходилось в среднем более одной бицеллы. Во-вторых, для ряда белков (например, HER3 и EphA2), несмотря на наличие в последовательности одного или более гликофоринового мотива, димеризация осуществлялась с использованием другого интерфейса. В то время как гликофориновые мотивы приводят к большому углу скрещивания спиралей, и, как следствие к малой площади интерфейса, другие типы упаковки позволяют достичь большей площади контакта и минимизировать тем самым энергию взаимодействия. При этом, зачастую структуры из второго кластера оказываются чрезвычайно стабильными за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий, а также стекинга ароматических колец. Структуры с протяжённым интерфейсом не так сильно зависят от аминокислотных остатков в конкретных позициях, поэтому их достаточно сложно обнаружить методами точечного мутагенеза. Полный набор структур димеров ТМД использовался и для разработки новых методов предсказания конформаций пар взаимодействующих ТМ α-спиралей. Так, на основании полученных структур настраивались параметры оценочных функций в таких пакетах программного обеспечения, как PREDDIMER [478] и TMDOCK [477].

Таким образом, применение методик ЯМР-спектроскопии, предложенных в настоящей работе, позволило определить 14 структур димеров ТМД РТК, построить модели рецепторов в активном и неактивном состояниях, изучить "движущие силы" спираль-спирального взаимодействия в МБ.

5.3.2. Структуры ТМ доменов TLR.

Вторым классом объектов, изучавшихся в рамках данной работы, являются толл-подобные рецепторы (TLR). В отличие от РТК, TLR активируются по механизму ЛИД. При взаимодействии с патоген-ассоциированной молекулой (липополисахариды, пептидоклиганы, дцРНК) внеклеточные домены рецепторов димеризуются, что приводит к взаимодействию ТМ

доменов, и, предположительно, димеризации внутриклеточных TIR доменов TLR [493]. Последние при этом начинают взаимодействовать с адаптерными внутриклеточными белками (MyD88, TIRAP/MAL [494, p. 88]), что приводит к запуску внутриклеточного каскада сигнализации и врождённого иммунного ответа. При этом, множество данных свидетельствует о значимой роли ТМД, как стабилизирующего фактора лиганд-индуцированного димера полноразмерного рецептора [495]. Таким образом, в случае TLR не стояла проблема поиска двух различных состояний димера ТМД.

ТМ домены TLR имеют ряд особенностей. Во-первых, домены содержат остатки цистеина, иногда несколько, что затрудняет исследование в силу неспецифического замыкания ненативных дисульфидных связей. Во-вторых, как считалось, TLR содержат внутриклеточные примембранные регионы, которые являются чрезвычайно гидрофобными (HR [496,497]). HR сравнительно коротки (10 остатков) и чрезвычайно важны для активации рецепторов, случайное изменение порядка а.о. в последовательности HR приводит к потере функциональности TLR4 [497]. В-третьих, многие ТМД TLR не выявляют наличия классических гликофориновых мотивов. Поэтому, в рамках работы были выбраны два ТМ домена - TLR3 и TLR4. На примере TLR3 изучались потенциальные конформации димера ТМД TLR, вто время как на примере дополнительно TLR4 изучалась роль цитоплазматического примембранного региона.

В случае TLR3 в спектрах ЯМР в мицеллах DPC наблюдались три набора сигналов, причем интенсивности наборов по-разному зависели от соотношения белок/детергент (БД) (Рис.74), а параметры релаксации амидных групп указывали на различную скорость вращательной диффузии для трех состояний. Иными словами, было показано наличие трёх различных олигомерных состояний белка. С использованием методики определения олигомерных форм состояний МБ (см. 6.1) было показано, что в растворе мицелл ТМ домен TLR3 способен образовывать мономеры, а также стабильные димеры и тримеры. Из зависимостей интенсивностей сигналов от БД удалось получить полное отнесение сигналов метильных и амидных групп всех трёх форм, а с использованием гетероядерной фильтрации при двух различных соотношениях БД оказалось возможным разделение межмолекулярных кросс/пиков. Таким образом, впервые удалось получить пространственную структуру не только димера, но и тримера ТМД битопного клеточного рецептора (Рис. 75). Отметим, что взаимодействие между спиралями стабилизировалось за счёт трансмембранного полярного остатка N709, а также нескольких ароматических а.о.

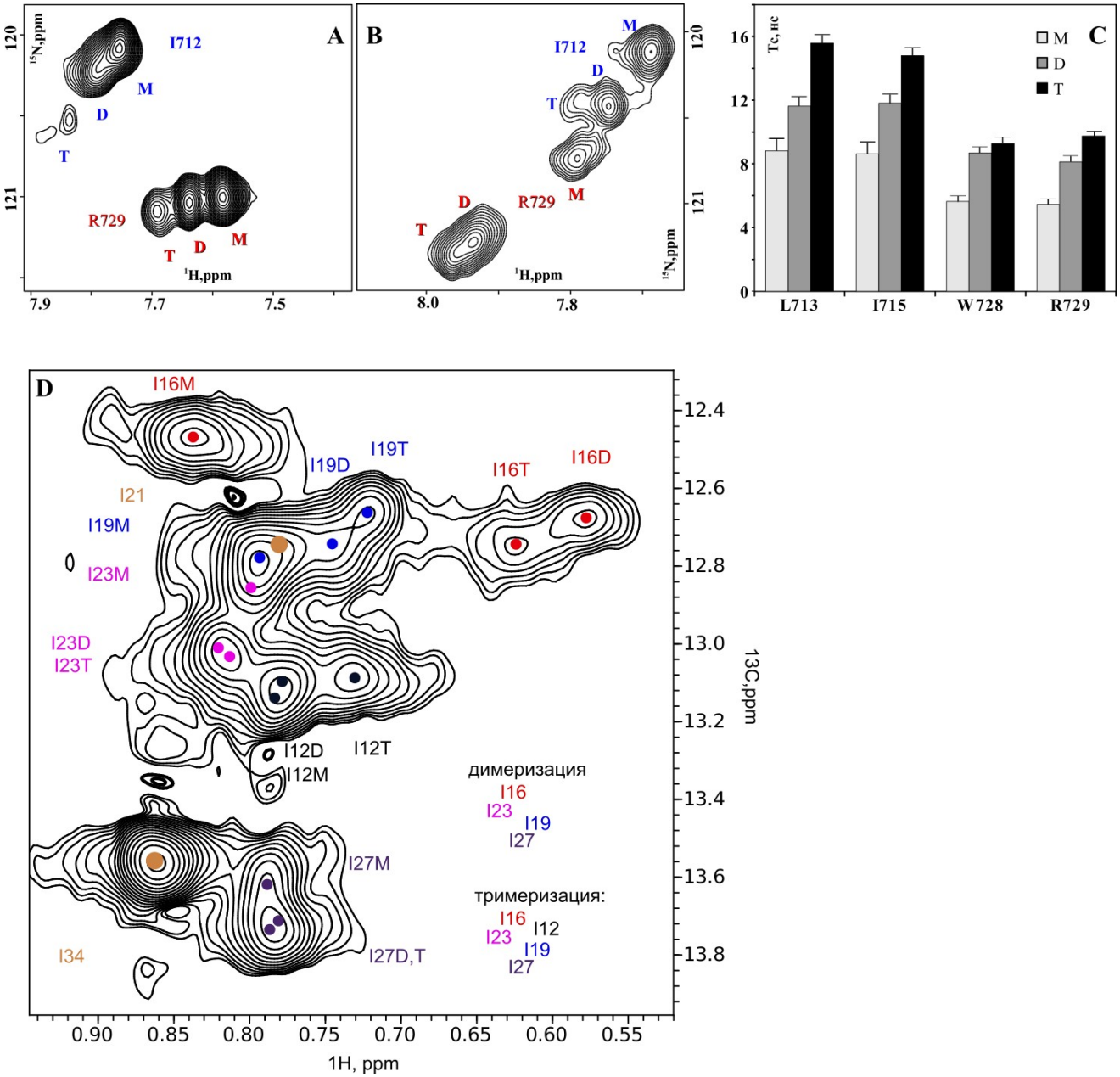

Рисунок 74. A,B - фрагменты спектра ^{1}H,^{15}N-HSQC ТМД TLR4, полученного при 45 ºC, pH 4.5 БД 80, указано отнесение сигналов к различным олигомерным формам белка (мономер M, димер D, тример T). **C** - время корреляции вращательной диффузии, измеренное для трех сигналов различных остатков при 45 ºC, pH 4.5 БД 80. **D** - фрагмент спектра ^{1}H,^{13}C-CT-HSQC, с указанием отнесения сигналов метильных групп Cδ1 остатков Ile.

В результате были получены два варианта спираль-спирального взаимодействия ТМД TLR3, каждый из которых может реализоваться в контексте полноразмерного рецептора. Очевидно, тример не является нативным состоянием ТМД - согласно данным рентгеноструктурного анализа внеклеточный домен TLR3 взаимодействует с вирусной РНК в димерном состоянии [498]. С другой стороны, базовым элементом симметричного тримера

является асимметричный димер, который может соответствовать лиганд-связанному состоянию TLR. Несмотря на то, что чаще всего гомодимеры белков являются симметричными можно встретить множество примеров, когда это не так, например, активное состояние димера киназного домена EGFR - асимметричный димер [499]. Интересно, что не так давно была построена модель полноразмерного рецептора TLR3 [498]. Модель была основана на кристаллической структуре внеклеточных доменов TLR3, структуре TIR доменов рецептора TLR10 [500]. Так вот, указанная модель предсказывает асимметричное взаимодействие ТМД, близкое по характеристикам к наблюдавшемуся в тримерной структуре ЯМР (Рис. 75D).

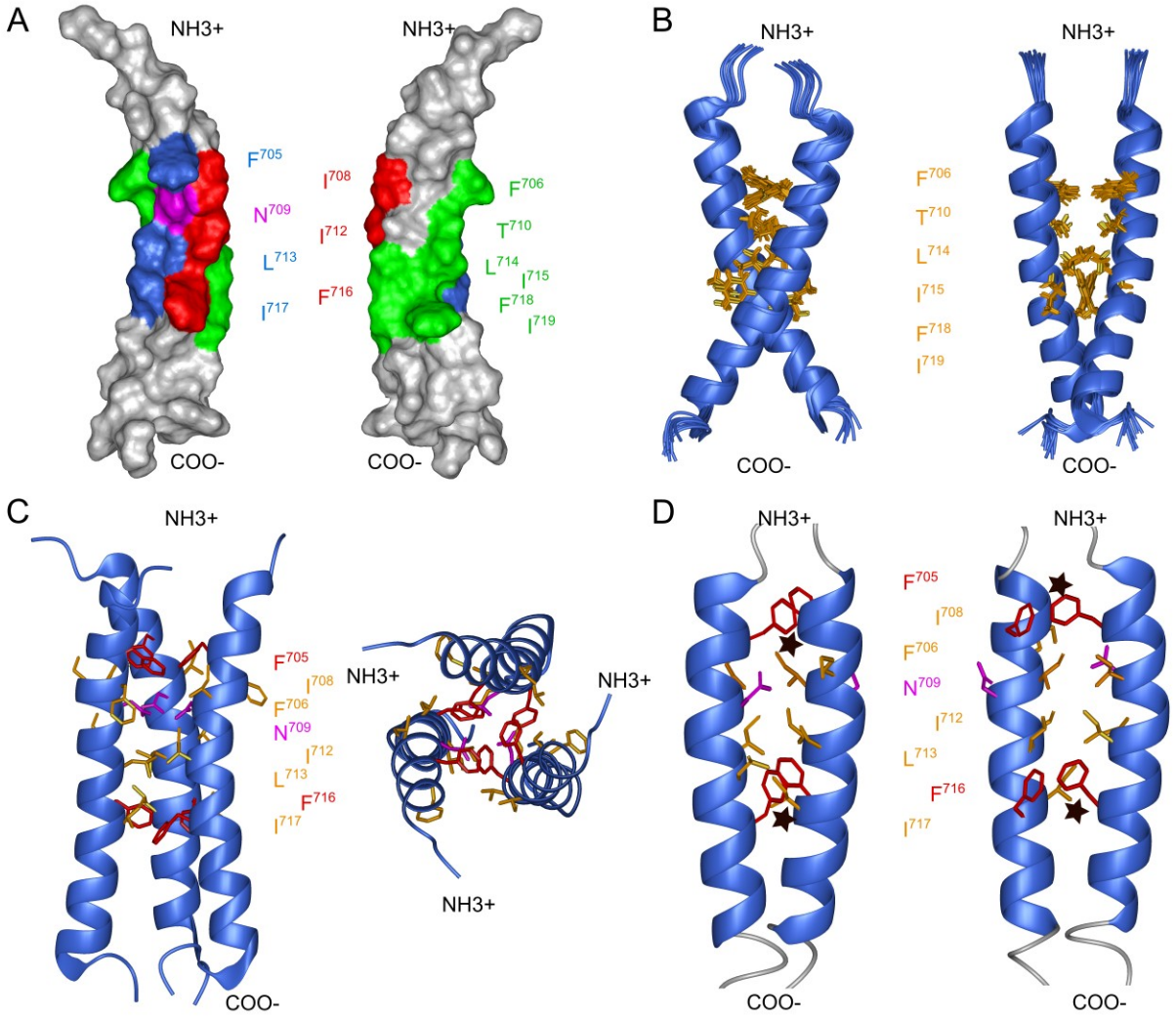

Рисунок 75. **A** - на поверхности мономера ТМД TLR3 указаны остатки, участвующие в димеризации (зеленым) и тримеризации(синим и красным). **B** - 10 лучших структур димера ТМД TLR3 в ленточном представлении. Структуры совмещены по атомам основной цепи ТМ α-спиралей. Указаны боковые цепи остатков на интерфейсе взаимодействия. **C** - структура тримера ТМД TLR3. Структуры **B** и **C** получены в мицелах DPC. **D** - конформация димера ТМД TLR3 в модели полноразмерного рецептора, представленной в работе [498].

С другой стороны, необходимо отметить, что в области ТМД модель характеризуется низким качеством и не основана на экспериментальных данных, встречаются стерические наталкивания. Таким образом, на настоящий момент вопрос о структуре ТМД TLR3 в активном состоянии рецептора остаётся открытым, есть два равнозначных вариантов, выбор между которыми можно сделать только на основании данных точечного мутагенеза.

В случае TLR4 основной задачей ставилось исследование роли примембранных участков HR в образовании димеров ТМД. Для этого в бесклеточной системе гетерологической продукции был получен короткий белок TL4tm, содержащий ТМД по данным UNIPROT и 3-5 фланкирующих остатков, а также удлинённый конструкт TLR4tmhr (624-670), содержащий ТМД, HR регион и 4-5 дополнительных остатков на концах. Белки были встроены в различные мембраноподобные среды - мицеллы DPC, бицеллы DMPC/DHPC, а также анионные бицеллы DMPG/DHPC. Удивительно, но во всех трёх типах мембраноподобного окружения HR регион не образовывал отдельный элемент вторичной структуры а являлся продолжением ТМ α-спирали, которая имела длину 33 а.о. (631-663) (Рис. 76). На основании данных ЯМР была рассчитана пространственная структура ТМ домена, которая подтвердила предварительные данные анализа химических сдвигов. Основной причиной, по которой HR-регион был выделен в отдельный элемент структуры TLR является заряженный остаток K653 и считающийся полярным остаток H657. Полученная структура TLR4tmhr показывает, что K653 находится в третьем витке ТМ α-спирали, его заряженная группа взаимодействует с ароматическими кольцами соседних остатков. pKa H657 оказывается смещено по сравнению с pKa остатка в конформации "неупорядоченный клубок" [501] и равняется 6.2, при нейтральных условиях боковая цепь остатка не заряжена, и не является сильно полярной. Полученная структура подтверждается и скоростями обмена амидных протонов с растворителем, ускоренный обмен наблюдается только для остатков 664-670, что говорит о стабильности водородных связей в регионе K653 и H657. Параметры ЯМР-релаксации также не выявляют значительных изменений подвижности HR участка по сравнению с ТМД, что косвенно подтверждает образование монолитной α-спирали. Таким образом, можно заключить, что TLR4 характеризуется наличием длинной ТМ спирали (33 остатка) с включением заряженной аминокислоты (Lys). Аннотация ТМ домена TLR4 в базе данных Uniprot неверна, что объясняется устаревшими алгоритмами предсказания ТМ спиралей. Более современные методы, основанные на полноостаточной шкале гидрофобности Уайта-Уимли с учётом отсутствия заряда H657 [502], предсказывают длину ТМД, сопоставимую с полученной в настоящей работе. Исследования HR участка по-видимому были интерпретированы неверно, поскольку часть HR региона является продолжением ТМ спирали, в

то время как другая часть - неупорядоченным фрагментом. Очевидно, что изменение порядка а.о. в таком участке должно влиять на длину ТМД, локализацию рецептора в микродоменах клеточной мембраны и, как следствие, на активность TLR4.

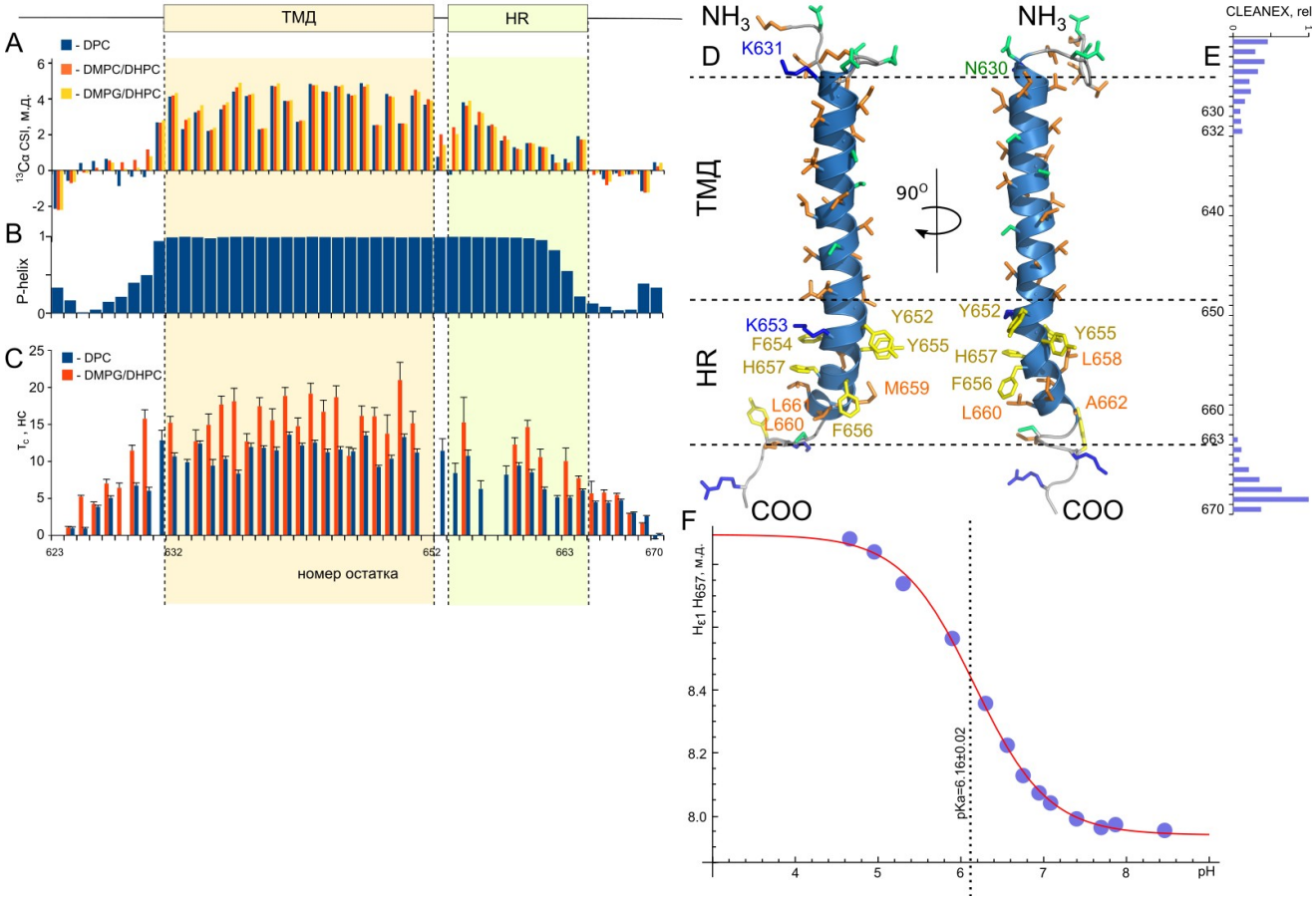

Рисунок 76. **A,B,C** - распределение вторичных химических сдвигов Cα в различных мембраноподобных средах (**A**), вероятности α-спиральной конформации по данным TALOS-N в бицеллах DMPG/DHPC [343] (**B**), времени корреляции вращательной диффузии (**C**) TLR4tmhr при 45 ºC. **D** - пространственная структура TLR4tmhr в бицеллах DMPG/DHPC по данным ЯМР. Указаны боковые цепи ароматических (желтым), неполярных (оранжевым), полярных (зеленым) и заряженных (синим) остатков HR участка и концевых неупорядоченных регионов. **E** - скорость обмена амидных протонов TLR4tmhr с растворителем по данным CLEANEX при 45 ºC, pH 7.0 **[503]**, в относительных единицах. **F** - зависимость химического сдвига протона Hε1 H657 от pH. Красной линией показан результат аппроксимации экспериментальных точек теоретической зависимостью с pKa=6.16.

В этой связи интересно рассмотреть другие рецепторы семейства. Выравнивание аминокислотных последовательностей показывает (Рис. 77), что все 10 белков содержат гомологичные гидрофобные "цитоплазматические" участки на С-концах ТМД, которые могут содержать в себе относительно большой фрагмент ТМ α-спирали. Аналогично TLR4 эти участки содержат 2-3 заряженных остатка и богаты ароматическими боковыми цепями. Чтобы

получить некоторую "меру" гидрофобности таких HR-регионов была применена шкала гидрофобности Уайта и Уимли, которая описывает свободную энергию переноса боковой цепи из полярного окружения в неполярное. Результаты анализа приведены в таблице 10. В качестве меры использовалась средняя свободная энергия переноса для первых 11-16 остатков на С-конце белка сразу после ТМД в соответствии с предсказанием базы UNIPROT. В качестве контроля была рассчитана гидрофобность ТМД TLR4, которая оказалась равна (-0.36 ккал/М) и внутриклеточного TIR домена белка (+0.38 ккал/моль). Гидрофобная часть HR участка TLR4, с включением K653 характеризовалась значением -0.39 ккал/моль, то есть являлась в среднем даже менее полярной, чем предсказанный ТМ участок, несмотря на присутствие заряженной боковой цепи. Схожие величины были получены для TLR2 и TLR10, в то время как существенно более высокая гидрофобность была обнаружена для TLR 7,8 и 9. В случае рецепторов TLR1,3,5 и 10 гидрофобность таких участков оказалась сравнительно невысокой, но ни один из изученных регионов, ранее считавшихся примембранными, не является полярным. Для сравнения, была оценена гидрофобность амфифильных примембранных α-спиралей РТК EGFR и HER2, которые оказались чрезвычайно полярными (+0.83-0.89 ккал/моль).

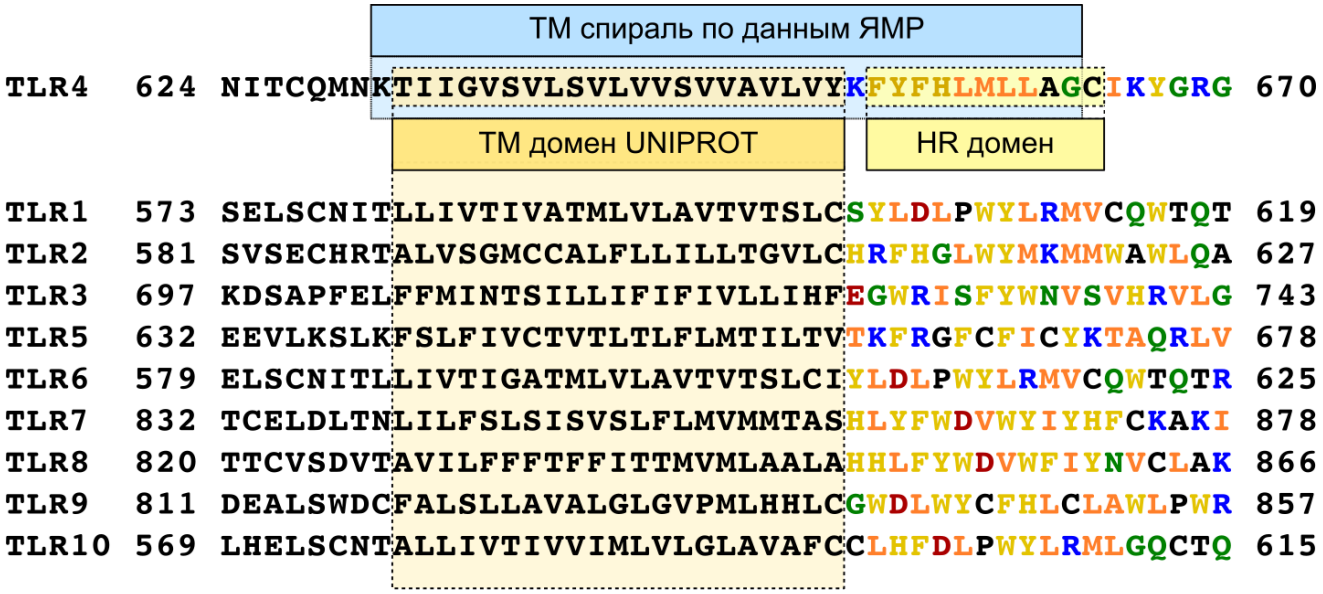

Рисунок 77. Выравнивание аминокислотных последовательностей ТМД и примембранных участков всех TLR человека. Остатки С-концевых участков, ранее считавшихся примембранными окрашены в соответствии с их физическими свойствами. Желтым показаны ароматические, оранжевым - алифатические, красным - отрицательно заряженные, синим - положительно заряженные, зеленым - полярные, черным - нейтральные аминокислоты.

Таблица 10. Гидрофобные свойства "примембранных регионов" TLR человека

Белок	Номера остатков[a]	Последовательность	Гидрофобность, ккал/М[b]	На остаток
TLR4 TM	632-652		-7.56	-0.36
TLR4 TIR	672-818		55.9	0.38
TLR4 HR	653 - 665	KFYFHLMLLAGCI	-5.13	-0.39
TLR1[c]	602-614	SYLDLPWYLRMVC	-2.34	-0.18
TLR2	610-625	HRFHGLWYMKMMWAWL	-6.72	-0.42
TLR3	726-738	EGWRISFYWNVSV	-0.28	-0.02
TLR5	661-671	TKFRGFCFICY	-0.99	-0.09
TLR6	608-619	YLDLPWYLRMVC	-2.82	-0.24
TLR7	861-873	HLYFWDVWYIYHF	-8.7	-0.67
TLR8	849-860	HHLFYWDVWFIY	-7.99	-0.66
TLR9	840-856	GWDLWYCFHLCLAWLPW	-10.58	-0.6
TLR10	598-610	CLHFDLPWYLRML	-4.5	-0.35
EGFR JMA[d]	676-686	KRTLRRLLQER	10.94	0.99
HER2 JMA	683-696	RKYTMRRLLQETEL	11.63	0.83

[a]нумерация остатков по Uniprot
[b] Гидрофобность - сумма вкладов отдельных остатков в соотвтетствии с работой [502]
[c] Здесь и далее показаны первые 11-16 остатков сразу после ТМД соответствующего TLR, до появления первой полярной а.к.
[d] Цитоплазматическая примембранная спираль белков EGFR и HER2.

Иными словами, можно однозначно заключить, что все TLR характеризуются длинными ТМ доменами (30-35 а.о.) с заряженными остатками на С-конце спиралей. При этом, такая структура ТМД может иметь своё биологическое объяснение - многие TLR активируются в липидных рафтах клеточной мембраны [180]. Как известно, рафты обогащены холестерином, а для этого липида найдены характерные мотивы специфического взаимодействия с ТМ доменами МБ [435]. Эти мотивы называются CRAC/CARC и обычно включают заряженный остаток и ароматические боковые цепи. С-концевые участки ТМД TLR как раз и несут в себе мотивы для взаимодействия с холестерином, что важно для правильного функционирования рецепторов.

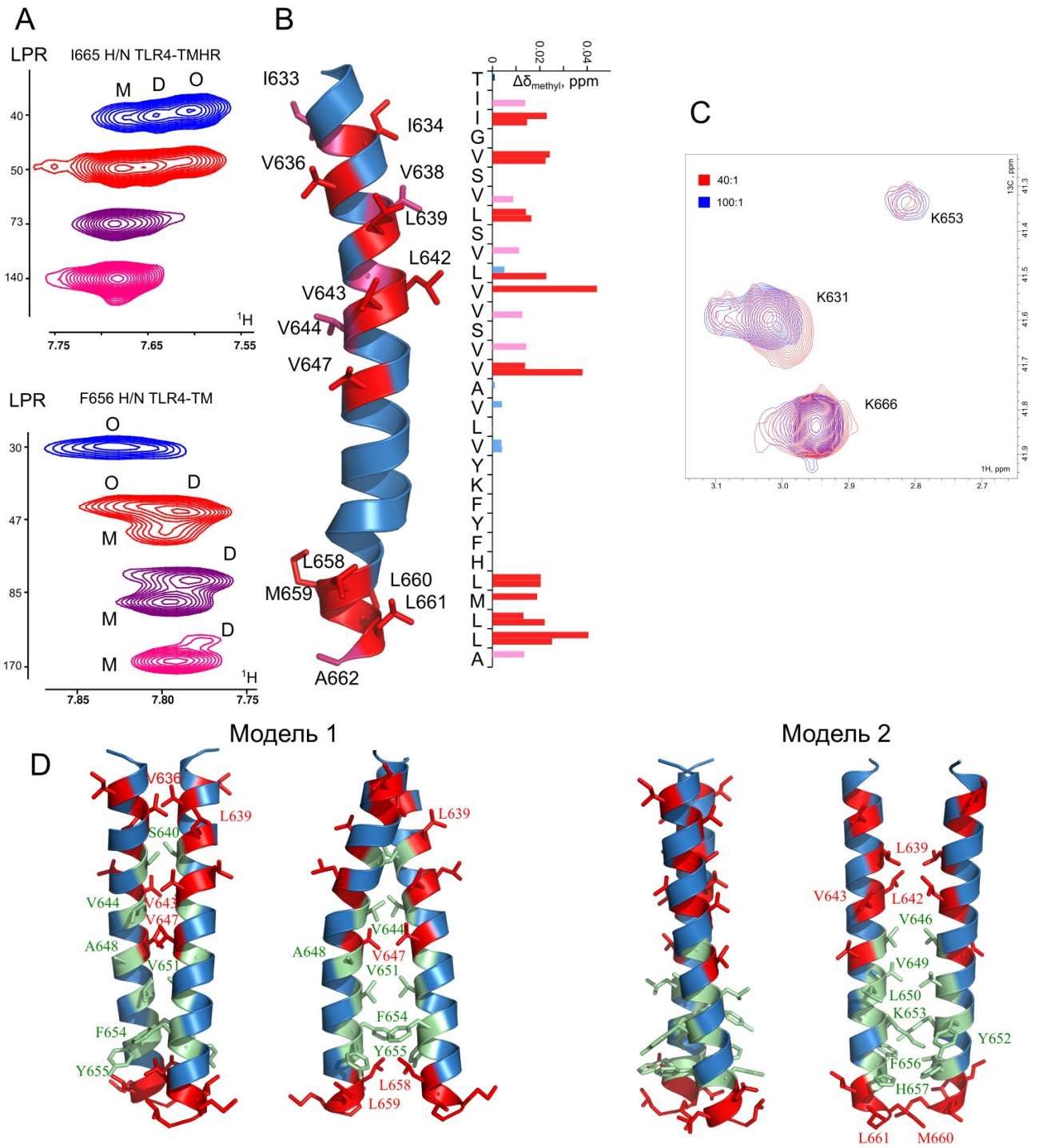

Рисунок 78. A - фрагменты спектров ^{1}H,^{15}N-TROSY-HSQC TLR4tmhr и TLR4tm при различных соотношениях липид/белок, LPR. **B** - изменение обобщенного химического сдвига метильных групп TLR4tmhr при димеризации в мицеллах DPC. Остатки с наибольшими изменнеиями указаны на пространственной структуре мономера белка красным и розовым цветом. **C** - суперпозиция фрагментов спектров ^{1}H,^{13}C-CT-HSQC TLR4tmhr в мицеллах DPC при LPR 40 и 100, с указанием отнесения сигналов. **D** - две модели димера TLR4tmhr, полученных в ПО TMDOCK, с наилучшим соответствием экспериментальным данным. Красным указаны боковые цепи с максимальными отклонениями хим.сдвигов метильных групп при димеризации, зеленым - боковые цепи других остатков на интерфейсе взаимодействия.

В связи со сказанным выше, отдельный интерес представляет способность такого длинного ТМ домена к димеризации, а также сама структура димера ТМД TLR4. Спектры ЯМР TLR4tm и TLR4tmhr, полученные при различных отношениях белок/липид в различном окружении, показывают, что в мицеллах DPC белки находится в равновесии между тремя олигомерными формами (мономер-димер-тример, рис. 78A). При этом, во всех типах бицелл белок стабилен исключительно при большом избытке липидов и находится в мономерной форме. При насыщении бицелл белком происходит осаждение. Поэтому, исследование димеризации TLR4tmhr проводили в мицеллах DPC.

Из-за присутствия олигомера высокого порядка, содержание димера не превышает 50% при всех исследованных соотношениях БД и концентрациях белка. Это не позволяет получить спектры ЯМР с гетероядерной фильтрацией, поэтому для изучения димеризации ТМД TLR4 было предложено использовать картирование интерфейса по пертурбациям химических сдвигов метильных групп (раздел 5.2). Изменения хим. сдвигов проявляют чёткую периодичность в 3-4 остатка и во многом совпадают для длинного и короткого варианта ТМД, что позволяет определить поверхность взаимодействия ТМ спиралей (Рис. 78B). В соответствии с разработанной методикой, был применён докинг ТМ доменов в программе TMDOCK [477], на выходе которого было получено 10 различных моделей димера, которые были отранжированы на основании соответствия интерфейса распределению изменений хим. сдвигов. В результате были выбраны две модели с наивысшей оценкой (Рис. 78D). В первой модели на интерфейсе димеризации присутствуют четыре остатка с сильнейшими изменениями химических сдвигов по данным ЯМР. Димер имеет правую закрутку и образуется по мотиву: ^{636}**V**xx**LS**xx**V**VxxVVxxVxxFYxxLL^{659}, угол между осями спиралей составляет 28º, расстояние между спиралями - 7.9 А. На интерфейсе спираль-спирального взаимодействия второй модели присутствует всего три остатка из найденных при анализе хим. сдвигов ЯМР. Полученная структура - левозакрученный димер с практически параллельной ориентацией спиралей (12º), расстоянием между спиралями 10.1 А, мотив димеризации включает следующие остатки: ^{639}VxxLVxx**V**xxVLxY**K**xxFHxx**M**L^{661} и смещён к С-концу ТМД. Вторая модель стабилизируется π-катионным взаимодействием заряда K653 с ароматическими кольцами нескольких остатков другой α-спирали. Тогда химические сдвиги боковой цепи лизина должны сильно изменяться при димеризации, что, однако, не было обнаружено в спектрах ЯМР (Рис. 78C). Это позволяет исключить вторую модель и сделать вывод, что с высокой вероятностью димеризация TLR4tmhr осуществляется в соответствии с моделью 1.

На основании структуры димера ТМД TLR4 была построена модель полноразмерного рецептора в димерном состоянии. Данная модель основана на структуре димера внеклеточных доменов TLR4 в комплексе с липополисахаридом [504], на структуре димера TIR доменов TLR10 [500], а также на структуре димера ТМД, полученной в представленной работе. Это первая в мире модель полноразмерного TLR в димерном состоянии, которая опирается на экспериментальные данные о структурной организации всех трёх частей рецептора - внеклеточной, трансмембранной и внутриклеточной. Сравнение полученной модели с предложенной ранее моделью полноразмерного рецептора TLR3 [498] приводится на рисунке 79. Видно, что несмотря на общее сходство внеклеточной и внутриклеточной части, ТМД значительно отличаются. В случае TLR3 можно наблюдать трансмембранную и примембранные спирали, соединённые короткой петлей, в то время как в построенной модели структура ТМД соответствует структуре TLR4tmhr в бицеллах и представляет собой длинную α-спираль, соединённую с TIR доменом рецептора неструктурированным линкером. Отметим, что модель TLR3 в области ТМД была построена на основании "здравого смысла" и ничего более, поэтому, можно заключить, что в рамках данной работы была получена первая точная модель рецептора семейства TLR.

В целом, необходимо заметить, что результаты исследования структуры ТМ доменов рецепторов TLR3 и TLR4 являются достаточно поучительными. Они наглядно демонстрируют важность экспериментального изучения пространственной структуры белков в связи с ошибочностью многих методов предсказания структуры, даже в приложении к такой простой задаче, как предсказание длины единственного α-спирального ТМ сегмента МБ.

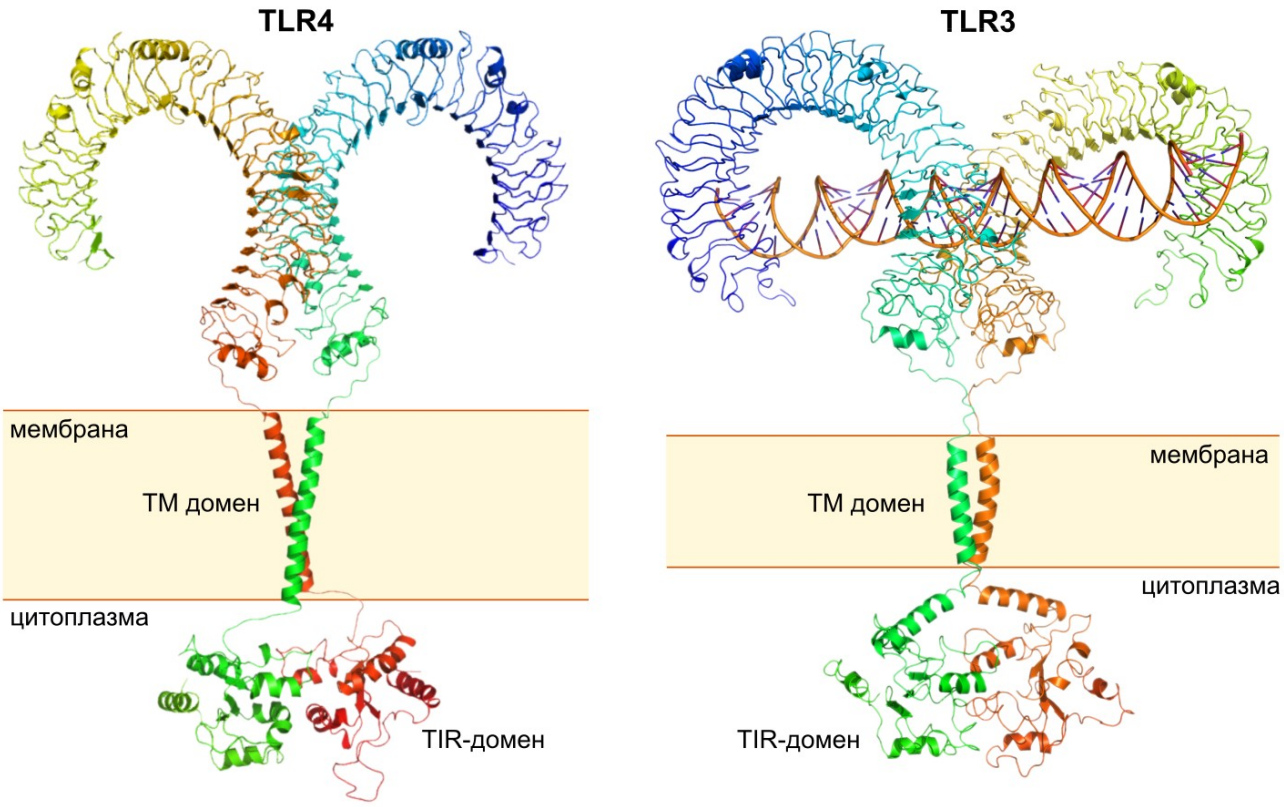

Рисунок 79. слева - модель полноразмерного рецептора TLR4, построенная в данной работе. Справа - модель полноразмерного рецептора TLR3, согласно статье [498].

5.4. Заключение

Резюмируя **главу 5** можно сделать следующие выводы:

1. Разработана методика определения пространственной структуры гомодимеров ТМ доменов МБ на основе ЯМР-спеткроскопии в мембраноподобных средах и гетероядерной фильтрации спектров ядерного эффекта Оверхзаузера. Показано, что оптимальным подходом является фильтрация по ^{13}C с последующей регистрацией сигналов метильных групп. При этом необходимо проведение контрольных экспериментов для исключения влияния "протечки фильтра". Для детекции по ^{13}C наилучшим подходом является использование эволюции с постоянной задержкой.

2. Изучена предсказательная сила различных измеряемых параметров ЯМР амидных и метильных групп МБ в отношении интерфейсов димеризации. Показано, что химические сдвиги амидных групп не не коррелируют с поверхностью взаимодействия между МБ, хим.

сдвиги метильных групп характеризуются ограниченной предсказательной силой, в то время как параметры подвижности метильных групп могут применяться для картирования интерфейсов диимеризации МБ с положительной предсказательной силой не менее 0.67. Предложен подход для построения моделей димеров МБ на основании наблюдаемых изменений параметров метильных групп при димеризации.

3. С использованием разработанных методик проведено исследование пространственных структур димеров ТМД рецепторов семейств РТК и TLR, получено 12 пространственных структур димеров и две структуры тримеров МБ. Результаты исследования позволили расширить представления о движущих силах спираль-спиральных взаимодействий в МБ, идентифицировать параметры активного и неактивного состояний димеров ТМД РТК, предложить новые механизмы активации рецепторов. На основе полученной информации о структурной организации ТМД TLR построена первая модель полноразмерного рецептора в димерном состоянии, использующая прямые экспериментальные данные о конформации всех трёх доменов TLR.

Глава 6. Разработка методов измерения свободной энергии и кинетики взаимодействия мембранных белков в мембраноподобных средах.

Пространственная структура - не единственный важный параметр взаимодействия между ТМ доменами МБ, который можно получить с использованием спектроскопии ЯМР высокого разрешения. Особый интерес представляют свободная энергия димеризации и равновесная кинетика процесса. Вместе с пространственной структурой свободная энергия позволяет вычленять вклады отдельных типов взаимодействий в димеризацию, оценивать влияние точечных мутаций, разрабатывать методы предсказания структуры и стабильности димеров ТМ спиралей. Более того, имея зависимость свободной энергии от температуры, можно определить термодинамические параметры димеризации, такие как изменение энтропии, энтальпии и теплоёмкости системы. В свою очередь, на основании кинетики можно определить энергию активации димеризации. Вместе, указанные параметры проясняют физические основы взаимодействия между ТМ спиралями, которые лежат в основе укладки α-спиральных МБ.

6.1. Определение заселенностей олигомерных форм

Основные методы измерения свободной энергии взаимодействия между МБ приведены в главе 3. Очевидно, что большинство методов (за исключением калориметрии) опираются на определение заселённостей различных олигомерных форм белка в зависимости от концентрации, что в дальнейшем конвертируется в константу димеризации/олигомеризации и свободную энергию. При использовании ЯМР-спектроскопии проблема возникает на самом первом этапе и заключается в корректном преобразовании интенсивностей сигналов в спектрах ЯМР в заселённости различных состояний белка. Большинство белков, изученных в представленной работе, участвовали в медленном конформационном обмене между олигомерными формами, то есть в спектрах ЯМР наблюдались несколько наборов сигналов, соответствующих различным состояниям ТМ доменов (см. например Рис. 78А). При этом, измерить интенсивности таких сигналов, можно только с использованием двумерной гетероядерной спектроскопии (HSQC, TROSY), из-за значительного перекрытия сигналов в одномерных спектрах. Однако, регистрация двумерных спектров осуществляется с использованием сложных импульсных последовательностей, которые содержат различные задержки, во время которых часть намагниченности ориентирована перпендикулярно внешнему

магнитному полю (в поперечной плоскости) и испытывает поперечную релаксацию. В результате, из-за поперечной релаксации, соотношение интенсивностей сигналов от различных форм МБ совсем не соответствует соотношению заселённости состояний. Более того, суммарная продолжительность задержек в спектре TROSY (20 мс) превышает возможную разницу во временах поперечной релаксации амидных протонов различных форм белка, что может привести в многократному отличию соотношения интенсивностей от соотношения заселенностей, и существенной систематической ошибки в случае неверной интерпретации. Дополнительно, возможен вклад от различной продольной релаксации амидных групп при недостаточной длине задержки между повторными накоплениями. Таким образом, первой задачей на пути к измерению энергии димеризации является измерение заселенностей олигомерных форм по интенсивностям сигналов в двумерных спектрах ЯМР.

В настоящей работе предлагаются три подхода, каждый из которых применялся для исследования взаимодействия МБ. В первую очередь, нужно отметить, что для регистрации спектров предлагается использовать оптимизацию продольной релаксации и спектры BEST-TROSY. Продольная релаксация амидных протонов при селективном возбуждении в МБ составляет 0.1-0.2 с [326], что позволяет записывать спектры ЯМР с минимальным влиянием T1 на интенсивность сигналов, при задержке между накоплениями 0.7-0.8 с вместо 3-5 с для стандартных экспериментов. Первый подход к измерению заселенностей состояний применялся при изучении гомодимеризации белка HER3tm и состоит в выборе сигнала с одинаковыми параметрами релаксации в исследуемых состояниях. Чаще всего это должен быть кросс-пик от боковой цепи остатков Trp или Arg, поскольку релаксация боковых цепей, экспонированных в окружение, меньше зависит от массы белка в целом, чем параметры сигналов основной цепи. Если преимущество подхода заключается в его простоте, то недостатки также очевидны. Сигналов с абсолютно идентичной релаксацией найти невозможно, поэтому результат измерений будет содержать систематические ошибки. Во-вторых, экспонированные в растворитель боковые цепи менее всего чувствительны к взаимодействию МБ, для них наблюдаются минимальные изменения химических сдвигов, перекрытие сигналов от различных форм белка, что затрудняет анализ.

Поэтому был предложен второй подход для восстановления заселённости сигналов из интенсивностей кросс-пиков в спектрах ЯМР, основанный на учёте параметров релаксации. Данная методика использовалась неоднократно с различными вариациями. Главное предположение заключалось в том, что основной источник потери интенсивности сигналов - поперечная релаксация протонов. Действительно, в то время как время поперечной релаксации

ядер азота в МБ из 1-2 спиралей составляет 30-50 мс, протоны релаксируют гораздо быстрее, в течение 10-20 мс. С учётом экспоненциального характера спада интенсивностей, вклад релаксации амидных протонов как минимум на порядок значительнее вклада азотов. Поэтому, при исследовании димеризации HER4tm в бицеллах применялась поправка, рассчитанная на основании полуширины сигналов по протонному направлению и времени в импульсной последовательности, когда намагниченность протонов находится в поперечной плоскости:

$$P_M / P_D = \frac{I_M}{I_D} \exp\left[\pi \Delta \nu_{MD} t_\Sigma\right] \quad (20),$$

где P_i - заселенность мономерного и димерного состояний, I_i - интенсивность сигналов в спектре, соответствующих данным состояниям, $\Delta\nu_{MD}$ - разница полуширин пиков двух состояний по протонному направлению спектра, а t_Σ - эффективное время, в течение которого намагниченность протонов находится в поперечной плоскости. Очевидно, что предложенный метод также должен приводить к систематическим ошибкам в анализе, из-за вкладов релаксации ядер азота и продольной релаксации протонов. Их можно избежать при учёте нескольких сигналов с различными параметрами релаксации. Если в спектрах присутствуют несколько отдельно стоящих сигналов, соответствующих различным олигомерным формам белка, предполагая, что изначальная интенсивность всех сигналов конкретной формы одинакова, можно аппроксимировать зависимость интенсивности от полуширины пика и восстановить начальную интенсивность пиков, соответствующую заселённости состояния. При этом, зависимость интенсивности от полуширины должна иметь один и тот же вид для всех состояний белка, поэтому следует проводить одновременную аппроксимацию нескольких серий сигналов.

Такой анализ был проведён для ТМД VEGFR2 с мутацией V769E (рис. 80). Этот белок образует три олигомерных формы, для каждой из которых можно найти 6-10 отдельно стоящих пиков. Для каждого из пиков был получен интеграл и полуширина по протонному направлению, зависимость интеграла от полуширины аппроксимировалась двумя моделями. Простая модель имела вид:

$$I = I_0 \exp\left[-\alpha R_2 t\right] \quad (21),$$

где I - наблюдаемая интенсивность, I_0 - интенсивность до потерь из-за релаксации, t - общая длительность импульсной последовательности, $R_2=\pi\Delta\nu$, а α - параметр аппроксимации, описывающий долю t импульсной последовательности, в течение которой происходит

релаксация. Более сложная модель, опиралась на анализ элементов матрицы плотности системы спинов, которые релаксируют на протяжении импульсной последовательности и имела вид:

$$I = I_0 \exp\left[-\alpha R_2 t_1 - R_2 t_3\right] \times \left(0.25 + 0.5 \exp\left[-\alpha R_2 t_2\right] + 0.25 \exp\left[-2\alpha R_2 t_2\right]\right) \quad (22),$$

где t_1, t_2 и t_3 - длительности блоков INEPT, обратный INEPT и "градиентное эхо" в эксперименте TROSY [505], а α - параметр аппроксимации. Оказалось, что обе модели согласуются с экспериментальными данными, а их использование позволяет получить практически идентичные соотношения заселенностей мономер/димер/олигомер. Следовательно, можно использовать более простую модель для анализа экспериментов (21).

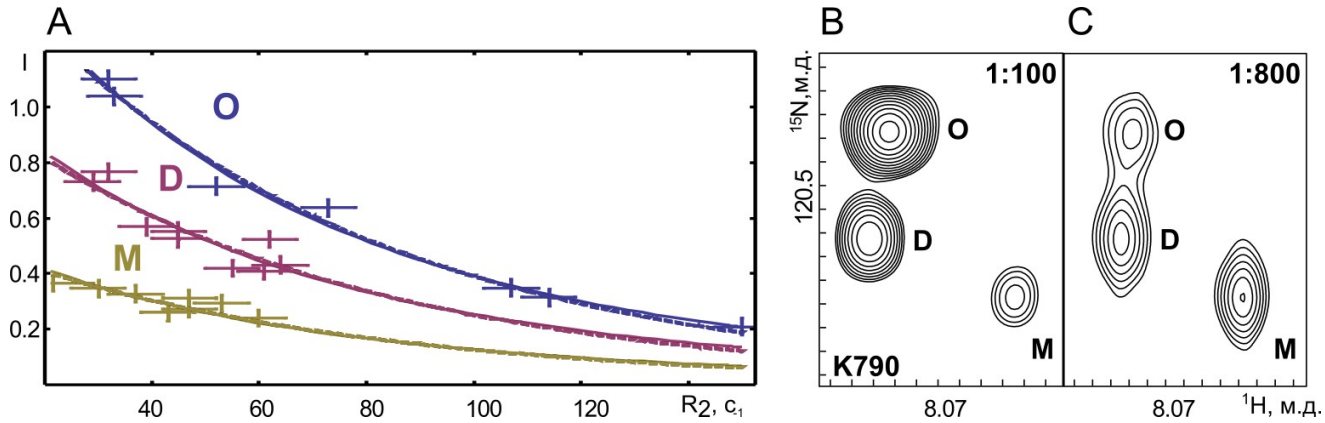

Рисунок 80. A - зависимости интенсивностей сигналов трех форм VEGFRtmV769E (мономер **M**, димер **D** и олигомер **O**) от скорости поперечной релаксации амидных протонов в спектре ^{1}H,^{15}N-TROSY (LPR 100). Зависимости аппроксимированы уравнениями (21) и (22) (результат показан сплошной и пунктирной линиями). **B,C** - фрагменты спектра ^{1}H,^{15}N-TROSY VEGFR2tmV769E полученный при соотношении LPR 100 и 800. Фрагменты содержат сигналы трех форм остатка K790, отнесение сигналов приведено на рисунке.

Предложенный метод является наиболее точным, однако требует присутствия в спектрах ЯМР большого количества хорошо разрешённых пиков отдельных олигомерных форм МБ, что зачастую недостижимо. В некоторых случаях, определять заселённость состояний необходимо имея только два сигнала одного а.о. В этой связи был предложен третий подход, который опирается на отслеживание изменений интенсивности сигналов при серийном разведении, которое лежит в основе всех экспериментов по измерению константы димеризации. Данный подход основан на предположении, что при изменении соотношения LPR и концентрации пептида не изменяются параметры релаксации сигналов, соответствующих различным олигомерным формам белка. В этом случае, если скорректировать интенсивности сигналов в спектрах с учётом разбавления, должна наблюдаться линейная зависимость интенсивностей сигналов от различных форм:

$$I_M^n + \alpha I_D^n = const \qquad (23),$$

где I^n - интенсивность на единицу концентрации суммарного белка. Как показали измерения, соотношение (23) выполняется для большинства изученных ТМД, пример эксперимента по серийному разбавлению приведён на рисунке 81. Исключение составляют ТМД, способные образовывать олигомеры высокого порядка, настолько большие, что их наличие не приводит к появлению сигналов в спектрах ЯМР. Следует отметить, что последний подход является наиболее быстрым и удобным с точки зрения обработки данных, однако требует особого внимания к постановке экспериментов. Все спектры ЯМР в серии должны быть получены идентичным способом, при разведении не должна изменяться ионная сила раствора, количество липида/детергента, не должно быть чрезмерно велико, чтобы не влиять на поперечную релаксацию белков в растворе.

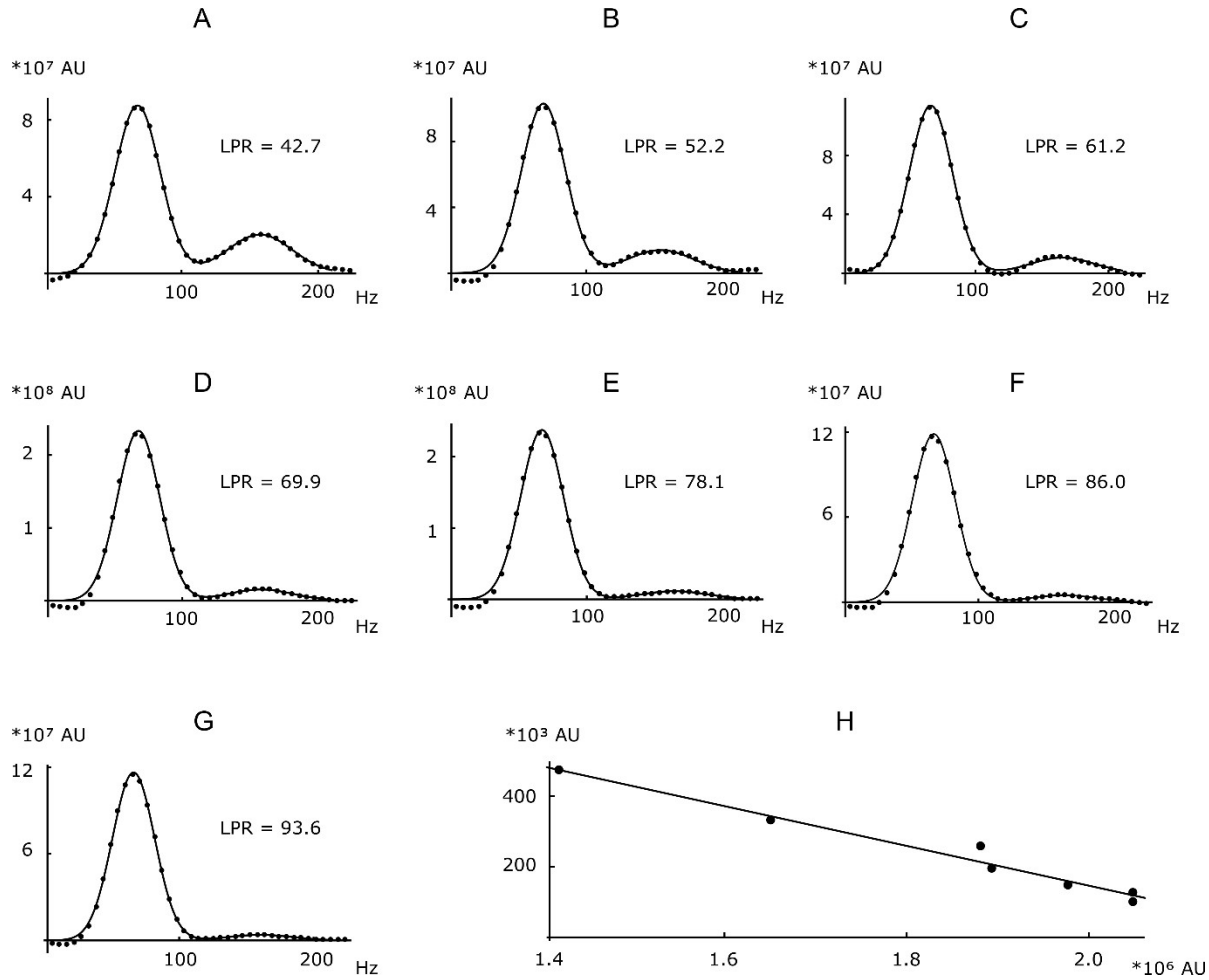

Рисунок 81. A-G - одномерные проекции по оси ^{1}H фрагментов спектров ^{1}H,^{15}N-TROSY белка HER4tm в бицеллах DMPC/CHAPS q=0.5 при pH 6.0 и 30 ºC. Фрагменты содержат сигналы от мономерной (слева) и димерной (справа) формы остатка G656. Спектры получены при различном соотношении липид/белок LPR. **H** - зависимость I_D^n от I_M^n, аппроксимированная уравнением (23).

Такой подход был использован при анализе димеризации ТМД TLR3tm, TLR4tm, HER4tm, HER2tm и TrkAtm. Таким образом, были предложены несколько методик для измерения заселённостей олигомерных состояний по двумерным гетероядерным спектрам ЯМР. Подход на основе зависимости интенсивности от полуширины пиков является наиболее точным, но чрезвычайно времязатратным и имеет ограниченную применимость, в то время как подход на основании изменения интенсивности сигналов при разбавлении применим к любым белкам с медленными переходами между олигомерными формами, но может приводить к систематическим ошибкам в интерпретации данных.

6.2. Модели равновесия и константа димеризации

6.2.1. Димеризация в мицеллах

Вторая проблема, с которой сталкиваются исследователи при измерении энергии димеризации, заключается в выборе правильной модели процесса, происходящего при взаимодействии МБ в мицеллах детергента. В случае растворимых белков, все предельно понятно и константа диссоциации имеет вид:

$$K_D = [M]^2 / [D] \qquad (24),$$

где [M] и [D] - концентрации димера и мономера белка, которые можно легко вычислить, имея заселённости состояний, полученные как описано в разделе 6.1. Логично предположить, что в случае мембранного белка в мембраноподобной среде, молярные концентрации в уравнении (24) необходимо заменить на активности, которые должны быть равны отношению концентраций белка к концентрации мембраноподобной среды. Тогда уравнение (24) примет следующий вид:

$$K_D = \frac{[M]^2}{[D][Lip]} \qquad (25),$$

где [Lip] - концентрация липидов или детергентов мембраноподобной среды. Несмотря на логичность предположения, первые работы по изучению димеризации ТМ домена GpA в мицеллах различных детергентов, проведённые методами АУЦ и FRET в конце 1990х начале 2000х гг. показали, что соотношение (25) в большинстве случаев не выполняется и константа диссоциации димера белка в растворе детергента имеет следующий вид [374,376]:

$$K_D = \frac{[M]^2}{[D][Lip]^{\gamma}} \quad (26),$$

где γ - эмпирический коэффициент. Поскольку с точки зрения химической кинетики параметр γ выглядит как порядок реакции по детергенту, было высказано предположение, что физический смысл коэффициента - количество молекул липида/детергента, которые высвобождаются при димеризации из-за разницы размеров мицелл с димером, мономером белка и без него. Впоследствии было предложено считать стандартной энергией димеризации - энергию полученную из выражения (26) в детергенте с γ=1 [374], стандартными условиями при этом считается концентрация детергента 1 М. Для определения γ и свободной энергии при этом удобно пользоваться следующей формой уравнения:

$$\Delta G_0 = RT \ln(K_D) = RT \ln([M]^2/[D]) - \gamma RT \ln([Lip]) = \Delta G_{app} - \gamma RT \ln([Lip]) \quad (27),$$

где ΔG_{app} называется кажущейся энергией димеризации. Построив график в координатах ΔG_{app} от RTln([Lip]) можно по наклону прямой определить γ, а по свободному коэффициенту - стандартную свободную энергию.

Измерения свободной энергии димеризации МБ при помощи ЯМР были впервые проведены для белка HER3tm в мицеллах DPC, данные анализировались с применением описанного выше подхода. Как оказалось, график ΔG_{app} от RTln([Lip]) не соответствовал уравнению (27), вместо линейной зависимости наблюдался излом/изгиб в районе LPR 100. То есть, при избытке мицелл наблюдается линейная зависимость с γ=2.2, в то время как в "насыщенных условиях", когда на одну мицеллу в среднем приходится более одной молекулы белка, димеризация "усиливается" и наблюдается прямая с наклоном γ=6.8 (Рис. 82). Тогда было высказано предположение, что усиление димеризации вызвано изменением кинетики процесса - в насыщенных условиях димеризация/диссоциация вынужденно происходит внутри одной мицеллы, в то время как в разбавленных условиях димеризация возникает только при соударениях мицелл. Впоследствии такой же изгиб кривой наблюдался и при исследовании димеризации HER4tm в бицеллах DMPC/DHPC, что указывает на общий характер наблюдаемых явлений. Следует отметить, что усиление димеризации в насыщенных растворах мицелл не наблюдалось ранее при исследованиях другими методами. В первую очередь потому, что GpA, который использовался в качестве модельного объекта во всех работах, образует чрезвычайно стабильный димер [506], который диссоциирует только в сильно разбавленных условиях.

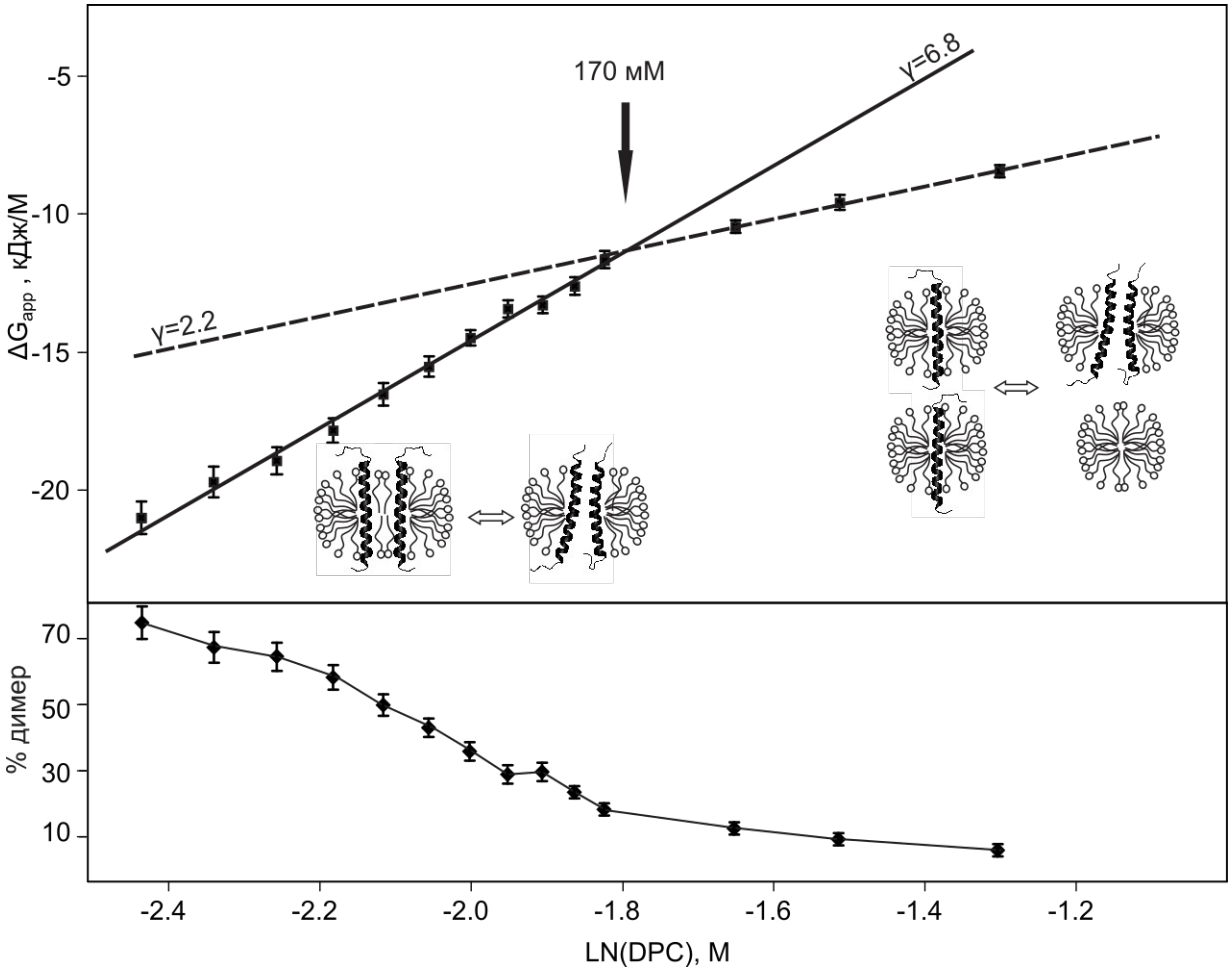

Рисунок 82. Сверху - зависимость ΔG_{app} от ln([DPC]) для HER3tm в мицеллах DPC при 40 ºC. Пунктирной и непрерывной линиями показан результат аппроксимации экспериментальных точек при концентрации DPC ниже и выше 170 мМ уравнением (27). Снизу приведена зависимость заселённости димерного состояния белка от ln([DPC]).

Несмотря на то, что предложенное обоснование выглядит разумным с точки зрения здравого смысла, оно никак не подтверждается с точки зрения термодинамики и кинетики процесса. Однако, наблюдаемое усиление димеризации можно объяснить, рассмотрев другую модель процесса димеризации. Все перечисленные выше рассуждения предполагали, что детергент является растворителем для ТМ белков. Однако, ситуация меняется, если представить, что мицеллы являются непосредственными участниками процесса димеризации и диссоциация димера может произойти только при соударении мицеллы с димером с пустой мицеллой, как было предложено **Лесовым Д.М.** Тогда процесс димеризации выглядит следующим образом:

micM+micM<=>micD+γ·micE, то есть соударяются две мицеллы с мономером с образованием γ пустых мицелл и мицеллы с димером. Учитывая, что концентрации мицелл с мономером и

димером равны концентрации белка в этих формах, уравнение (26) для такого процесса имеет вид:

$$K_D = \frac{[M]^2}{[D][micE]^{\gamma}} \quad (28),$$

где [micE] - концентрация пустых мицелл и

$$[micE] \times Ne + [M] \times Nm + [D] \times Nd = [Lip] \quad (29).$$

Здесь Ne, Nm и Nd - размеры мицелл без белка, с мономером и димером ТМД, соответственно. При этом параметр γ также должен зависеть от размера мицелл:

$$\gamma = \frac{2\,Nm - Nd}{Ne} \quad (30).$$

[M] и [D] измеряются экспериментально, Ne известно из литературы [40], поэтому совместное решение уравнений (28)-(30) дает модель равновесия, зависящую от трёх параметров - K_D, Nm и Nd, которые можно определить при аппроксимации экспериментальных данных. Впервые такой подход, названный "моделью мицеллярного растворителя" был опробован на белках FGFR3tm и VEGFR2tm. Несмотря на кажущееся сходство уравнений (26) и (28) использование концентрации пустых мицелл вместо концентрации детергента позволяет объяснить усиление димеризации в насыщенном растворе. При низком соотношении липид/белок концентрация пустых мицелл оказывается малой, что смещает равновесие в сторону димеризации. При этом, при высокой степени разбавления, когда LPR>>Ne, две модели эквивалентны. Это хорошо видно при сравнении различных моделей (Рис. 83). В случае VEGFRtm, который образует чрезвычайно стабильный димер и изучается при LPR>200, отклонение от линейной зависимости из-за использования модели (28) оказывается минимальным и может быть убрано простой коррекцией (29) в предположении, что Nm=Nd=Ne=55 (далее - упрощённая модель (28)). В то же время для "слабого" димера FGFR3tm отклонение от линейного характера является существенным и не исправляется при применении упрощённой модели (28). Проведённая проверка показывает применимость модели (28) и её вероятную достоверность. Благодаря данной модели при помощи ЯМР можно изучать концентрации даже чрезвычайно "слабых" димеров, для которых модель (26) оказывается неприемлемой, что невозможно при использовании FRET и АУЦ.

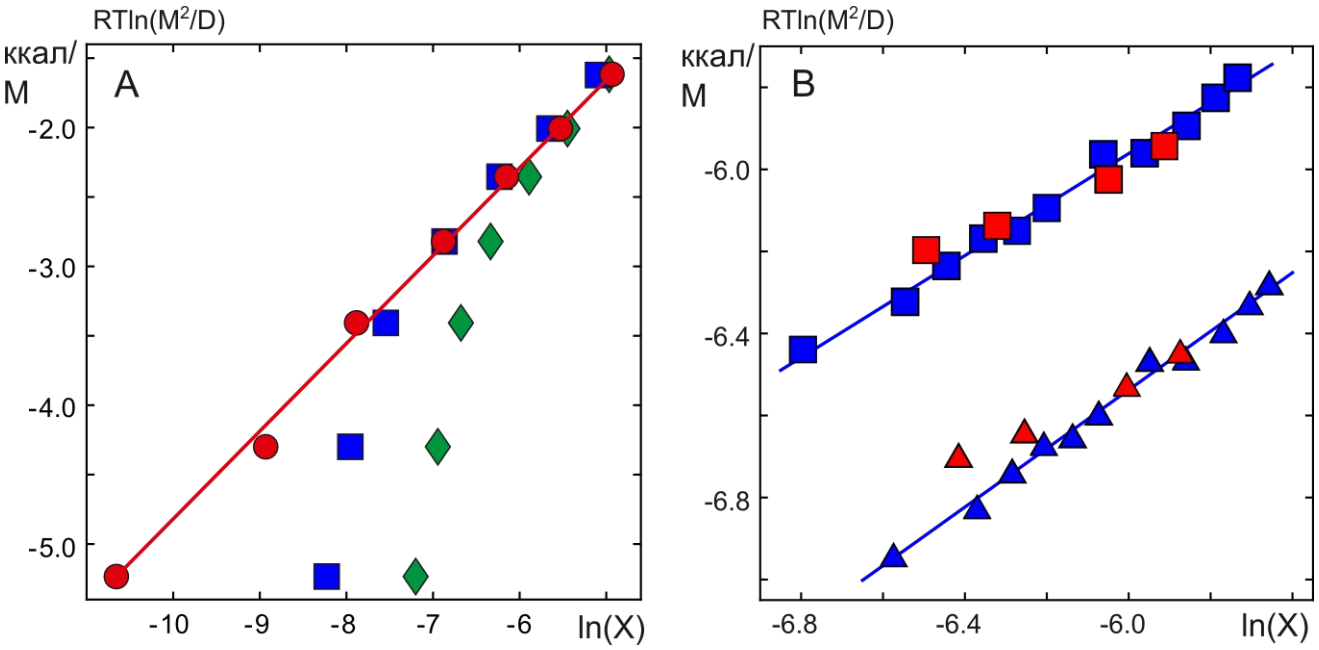

Рисунок 83. A - ΔG_{app} , измеренная для FGFR3tm в мицеллах DPC/SDS 10:1 при 40 ºC приведена как функция ln(X), где X = [Lip]/Ne (зеленые ромбы, модель (26)), X=[Lip]/Ne-[M]-[D] (синие квадраты, упрощенная модель (28)) и X=[[micE] (красные круги, модель (28)). **B -** ΔG_{app} VEGFR2 в мицеллах DPC построена как функция ln(X), где X = [Lip]/Ne (нижняя кривая), X=[Lip]/Ne-[M]-[D] (верхняя кривая). Точки, обозначенные синими треугольниками получены последовательным разбавлением концентрированным раствором DPC. Точки, обозначенные красными треугольниками получены после трехкратного разбавления водой с последующим титрованием концентрированным раствором DPC.

6.2.2. Димеризация в бицеллах

Ключевым предположением, на котором основывается модель (28), является невозможность диссоциации димера внутри одной мицеллы. Для мицеллы данное утверждение является практически самоочевидным, поскольку частицы имеют малый размер, количество детергента в частице достаточно, чтобы окружить МБ, но недостаточно, чтобы обеспечить "прослойку" между двумя мономерами. В случае малых изотропных бицелл, используемых в спектроскопии ЯМР высокого разрешения, это предположение тоже должно выполняться. Анализ данных, описанных в главе 4 показывает, что число молекул липида с длинной ацильной цепью в бицеллах DMPC/DHPC q=0.33 и схожих по размеру DMPC/CHAPS q=0.5 равняется 12-18, что явно недостаточно для существования двух молекул мономера МБ внутри одной бицеллы. То есть, диссоциация димера может происходить только при соударении двух бицелл и для анализа равновесия димер/мономер МБ в изотропных бицеллах можно использовать модель (28), что подтверждается видом зависимости (27). При этом, во многих случаях в бицеллах переходы димер/мономер являются медленными, что позволяет проводить измерения свободной

энергии димеризации, одним из удобных объектов является ТМ домен рецептора HER4, HER4tm. В рамках данной работы белок был встроен в бицеллы DMPC/DHPC и DMPC/CHAPS, были проведены измерения зависимости заселенностей мономерного и димерного состояний, которые затем анализировали с использованием уравнений (28)-(30). ЯМР спектры HER4tm содержат два набора сигналов, при этом картина "двоения" сигналов не зависит от типа ободообразующего агента и размера бицеллы (Рис. 84). Несмотря на то, что амидные протоны являются слабым предиктором интерфейсов димеризации, в целом спектр $^{1}H,^{15}N$-HSQC является "отпечатком пальца" структуры белка, идентичность спектра свидетельствует об идентичности структуры. Иными словами, мы не можем предсказать структуру димера на основании картины "двоения" сигналов, но идентичность хим. сдвигов в различных условиях позволяет заключить, что структура димера во всех трех условиях одинакова, какая бы она ни была.

С другой стороны, анализ полученных заселенностей показал, что применение модели (28) в случае бицелл является затруднительным. В обычном виде модель будет иметь четыре параметра - K_D и три размера бицелл. Оказалось, что параметры сильно коррелируют и при аппроксимации получаются значения, лишённые физического смысла (например бицеллы, размером 300-400 молекул липида, что противоречит данным динамического светорассеяния и диффузии по ^{1}H ЯМР). Таким образом, необходимо задаться теоретическим размером бицелл в присутствии и в отсутствие мономера или димера α-спирального белка. Для этого можно использовать данные из главы 4 - параметры модели идеальной бицеллы, выражения (7) и (8) для "пустых" бицелл, (17) - для бицелл с белком и значения λ и r из таблицы 6. Таким образом можно рассчитать радиус R бицелл, который конвертируется в число молекул липида в бислое, если известна площадь бислоя, приходящаяся на одну молекулу липида:

$$N_i = \frac{2\pi(R - r - S_{prot})^2}{S_0} \qquad (31),$$

где S_{prot} - площадь, занимаемая белком на поверхности бислойного участка бицеллы (0 в случае "пустых" бицелл). Оценки на основе данных компьютерного моделирования позволяют предположить, что S_{prot} = 1.2-1.5 нм^2 на одну ТМ спираль. В свою очередь, S_0 - площадь, приходящаяся на одну головку липида в бислое. Если зафиксировать параметр S_0, в соответствии с литературными данными о структуре бислоев различного состава [413,426], можно превратить четырехпараметрическую модель (28)-(30) в однопараметрическую модель (28)-(31). Можно оставить S_0 параметром модели, однако, оказывается, что S_0 и K_D также значительно скоррелированы в условиях слабой димеризации HER4tm, и подбор параметра при

аппроксимации может приводить к значениям, заведомо лишённым физического смысла. Таким образом, в дальнейшем использовалась однопараметрическая модель, которая, как необходимо отметить, базируется на большом числе предположений:

1) Предположение об одинаковой упаковке липидов в бицеллах и бислоях (фиксированное значение параметра S_0).

2) Предположение, что бицеллы идеальны (уравнения (7) и (8)).

3) Предположение о том, что "пустые" бицеллы и бицеллы с белком, находясь в смеси, формируются с одним и тем же соотношением q (уравнение (17)).

4) Предположение о площади, занимаемой молекулой белка.

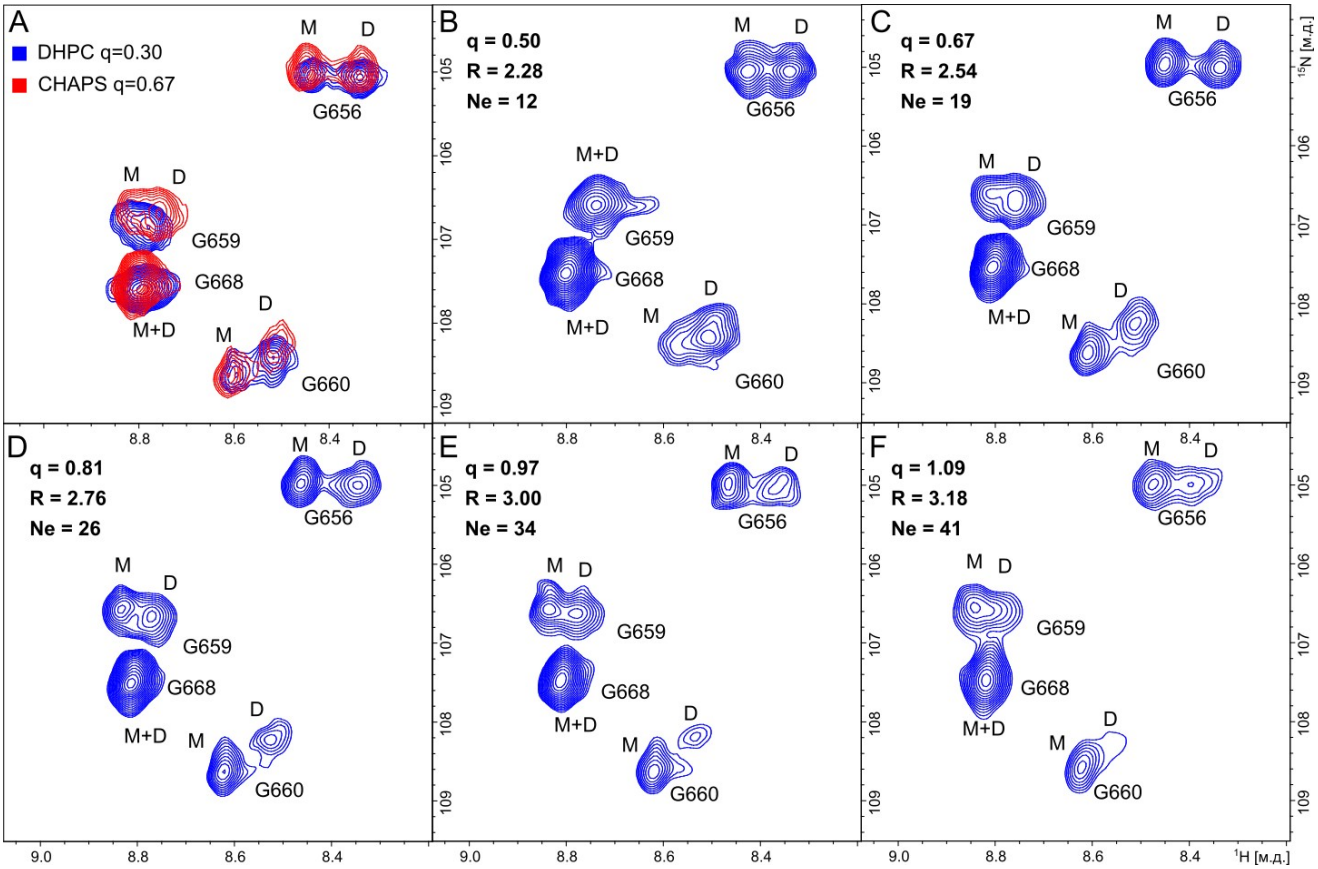

Рисунок 84. A - суперпозиция фрагментов спектров ^{1}H,^{15}N-TROSY HER4tm в бицеллах DMPC/DHPC q=0.3 и бицеллах q=0.67 DMPC/CHAPS. Фрагменты содержат сигналы от остатков Gly, отнесение к мономерной (M) и димерной (D) формам белка указано на спектре. **B-F** - идентичные фрагменты спектров ^{1}H,^{15}N-TROSY HER4tm в бицеллах DMPC/CHAPS, приготорвленных с различными q. Параметры частиц: q, R и Ne приведены на спектрах. Все спектры получены при 30 ºC на спектрометре с рабочей частотой 800 МГц.

Перечисленные предположения подтверждаются экспериментальными данными, но тем не менее могут являться ошибочными. К сожалению, это единственный способ получения свободной энергии в малых бицеллах для слабых димеров, таких как HER4tm. В случае стабильных димеров модель (28) вырождается в модель (26) при сильном разбавлении и вклад от неправильного определения размера частиц не слишком велик. С использованием описанной методики были проведены измерения димеризации в бицеллах DMPC/CHAPS q=0.5 и q=0.8, которые выявили свободную энергию равную **-1.2±0.2** и **-0.8±0.2** ккал/М, соответственно. Изменение энергии не является достаточно большим, чтобы его можно было счесть достоверным или, более того, существенным. Как будет показано позднее, изменение липидного состава бицелл приводит к гораздо более заметным эффектам. Полученные данные являются важными, поскольку в очередной раз показывают эквивалентность самых малых бицелл, используемых в структурных исследованиях МБ и частиц большего размера. Ранее уже было показано, что большие и малые бицеллы эквивалентны с точки зрения структуры ТМ α-спирали (раздел 4.9) и с точки зрения состояния липидов (4.11), приведённый пример показывает эквивалентность с точки зрения спираль-спирального взаимодействия: энергия и структура димера не зависит существенным образом от размера частиц бицелл.

6.3. Кинетика димеризации МБ

Помимо свободной энергии интерес представляет и кинетические параметры процесса димеризации МБ - ведь на основании скорости переходов димер/мономер можно сделать вывод об энергетических барьерах. ЯМР-спектроскопия - один из немногих методов, при помощи которого можно измерять скорость обратимых процессов в равновесном состоянии, получая константы скорости прямой и обратной реакций. В литературе по ЯМР-спектроскопии принято использовать два типа классификации различных обратимых процессов по скорости. С точки зрения параметров ЯМР-релаксации быстрые движения - те изменения структуры белка, которые влияют на гетероядерный ЯЭО и продольную релаксацию и происходят быстрее вращательной диффузии молекулы (пс-нс). Медленные движения вносят вклад исключительно в поперечную релаксацию и происходят значительно медленнее вращательной диффузии (мкс-мс). С точки зрения химического сдвига, медленные процессы выражаются в наличии двух наборов сигналов спектрах, соответствующих двум различным состояниям молекулы. В этом случае должно выполняться соотношение:

$$\Delta\omega = 2\pi\Delta\nu \gg k_{ex} = k_1 + k_{-1} \qquad (32),$$

где Δν - разница химических сдвигов сигналов от различных состояний, k_{ex} - константа скорости обмена в c^{-1}, равная сумме констант скоростей прямой и обратной реакций, приведённых к реакции первого порядка (в случае реакции второго порядка константу скорости необходимо умножить на соответствующую концентрацию). В этом случае процесс называется медленным обменом в шкале химического сдвига. Если соотношение (32) не выполняется, будет наблюдаться один набор сигналов, имеющих усреднённый химический сдвиг, взвешенный с учётом заселенностей состояний. Для двух типов процессов существуют методики измерения константы скорости k_{ex}, в случае быстрого обмена можно исследовать вклад медленных движений в поперечную релаксацию R_{ex} с использованием дисперсии релаксации (CPMG или T1ρ [338]), в случае медленного обмена применяются так называемые ZZ-эксперименты, аналогичные спектрам ЯЭО (Рис. 85B) [507]. В таких экспериментах можно измерить интенсивность так называемых "обменных" кросс-пиков, возникающих из-за переходов между состояниями, в зависимости от длительности специальной задержки.

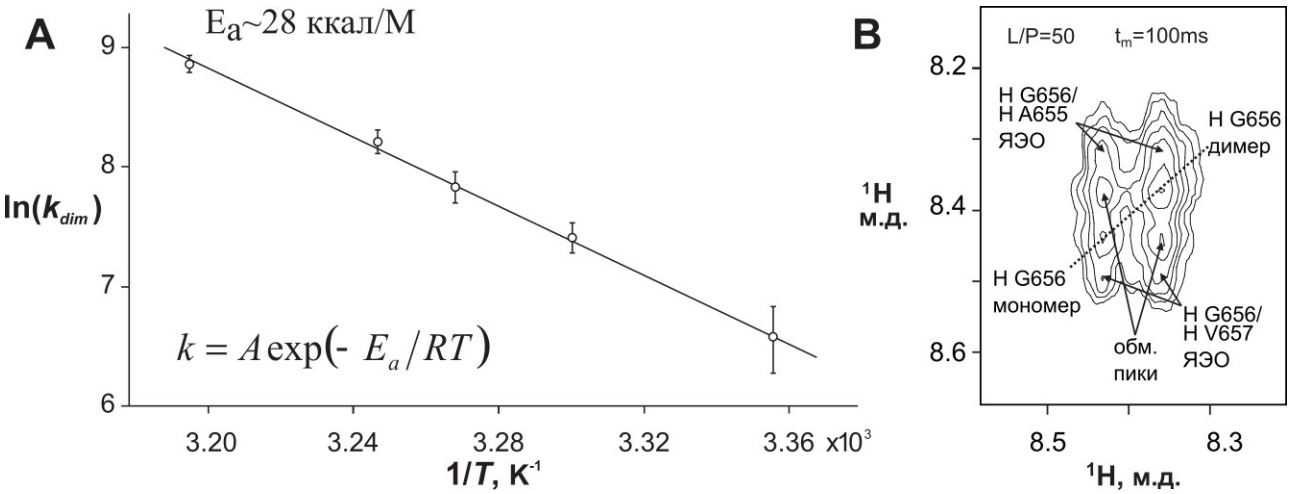

Рисунок 85. A - Зависимость логарифма константы скорости димеризации HER4rm в бицеллах DMPC/DHPC q=0.3, LPR=50 от 1/T. Линией показана аппроксимация точек уравнением Аррениуса с E_a=28 ккал/М. **B** - срез трехмерного спектра NOESY-^{1}H,^{15}N-HSQC HER4tm в бицеллах DMPC/DHPC при 33 ºC, содержащий сигналы от амидных протонов двух состояний остатка G656. Указаны диагональные и обменный кросс-пики.

В рамках представленной работы эксперименты по серийному разбавлению проводились для 12 TM доменов в мицеллах DPC и для 4 TM доменов в бицеллах DMPC/DHPC. В случае мицелл DPC для всех изученных белков при температурах вплоть до 50 ºC (более высокие температуры не исследовались) наблюдался медленный в шкале химического сдвига обмен мономер-димер. Для нескольких объектов, в том числе для TM доменов VEGFR2, HER3 , TLR3 были предприняты попытки измерить скорость обмена при помощи ZZ-экспериментов, однако

во всех случаях обменные кросс-пики не наблюдались для задержек длительностью до 600 мс. Отметим, что увеличение задержки невозможно из-за потери интенсивности сигналов из-за продольной релаксации (T_1~1 с). Ни для одного из изученных белков не наблюдалось обменных пиков в спектрах NOESY (120 мс). Таким образом, можно заключить, что в мицеллах DPC димеризация ТМ доменов происходит чрезвычайно медленно, скорость обмена k_{ex}<<2 $с^{-1}$.

В бицеллах наблюдается совершенно иная картина. Во-первых, некоторые ТМД, например HER2tm и EGFRtm, осуществляют быстрые переходы димер-мономер, то есть наблюдается один набор сигналов, при разбавлении изменяются химические сдвиги. Медленный обмен был выявлен для HER4tm, TrkAtm, для EGFR с примембранными регионами (EGFRtmjm). Детально изучить кинетику обмена димер/мономер удалось для HER4tm в бицеллах DMPC/DHPC q=0.3. При определённых условиях разница химических сдвигов для ряда остатков различных форм достигает 0.1 м.д., что позволяет зарегистрировать спектр NOESY, в котором присутствуют обменные кросс-пики (Рис. 85B). Анализ интенсивностей кросс- и диагональных пиков показывает, что константа скорости обмена составляет 30±5 $с^{-1}$, что минимум на порядок быстрее обмена в мицеллах DPC. Более того, наблюдается зависимость скорости от температуры. В случае медленного обмена, можно измерить константу скорости димеризации по уширению кросс-пика от мономера. Был проведён анализ формы линий сигналов остатка G656 HER4tm для двух образцов - содержащего только мономерную форму белка (LPR 200) и содержащего смесь мономер/димер 1:1. Из разницы полуширин сигналов рассчитывалась константа скорости k_1, в диапазоне температуры 15-40 ºС. Ниже 15 ºС медленная вращательная диффузия препятствует анализу спектров ЯМР, а выше 40 ºС обмен переходит из медленного в промежуточный, что выражается в слиянии сигналов от мономера и димера ТМД. Полученные значения были отложены на графике в координатах Ln[k](1/T), что позволило подтвердить экспоненциальный характер зависимости и показать, что энергия активации димеризации равна 28 ккал/моль (Рис. 85A). Эта величина чрезвычайно велика, превышая энергию образования нескольких водородных связей. Энергия активации соответствует вкладу взаимодействий белок/липид и липид/липид, который необходимо скомпенсировать за счёт взаимодействий белок/белок при димеризации.

Отдельно стоит рассмотреть причину различий в кинетике взаимодействий между белками в мицеллах и бицеллах. Можно предположить, что энергия активации в двух указанных системах не должна отличаться существенным образом, в силу схожести природы липидных компонентов мембраноподобных сред. Следовательно, причина отличия кроется в стерическом факторе. Во-первых, может вероятность слияния частиц при соударениях быть разной в двух

типах сред, что, правда, маловероятно, поскольку молекулы детергента в мицеллах сравнительно слабо упорядочены и столкновения мицелл должны быть менее упругими, чем столкновения бицелл. Во-вторых, при слиянии образуется короткоживущая переходная форма - увеличенная мицелла/бицелла с двумя мономерами. В случае мицелл молекулы белка в такой "двойной частице" будут ориентированы случайным образом, что понизит вероятность димеризации. В бицеллах, молекулы белка уже ориентированы вдоль нормали участка бислоя, что упрощает взаимодействие между ТМД.

6.4. Практическое применение разработанных методик

Может показаться, что свободная энергия димеризации имеет значения только для анализа вклада ТМД в общую способность белка образовывать димеры, однако это не так. Можно предложить несколько различных областей применения методик измерения свободной энергии димеризации МБ для исследования различных аспектов активации клеточных рецепторов с одним ТМ доменом.

6.4.1. Анализ влияния точечных мутаций

Одним из случаев, когда измерение энергии димеризации МБ необходимо, является изучение влияния точечных мутаций на параметры белка. Известно, что некоторые мутации в ТМ доменах белков с одним ТМ сегментом могут вызывать спонтанную лиганд-независимую активацию рецепторов или, наоборот, ингибировать их функции. Чаще всего к активации приводят замены гидрофобных аминокислот в определённых позициях на полярные или даже заряженные остатки - Arg и Glu [398,509]. Наиболее широко известна так называемая мутация Neu V659E в белке HER2, приводящая к раку молочной железы у крыс [398]. Описано множество схожих мутаций, в том числе G/R, G/E, V/E, V/D в рецепторах EGFR, HER2, FGFR3 [360,510]. При этом причина активации не совсем ясна, было высказано несколько гипотез. Согласно одной из них, полярная аминокислота нарушает встраивание ТМД в бислой, меняет длину ТМД и, за счёт взаимодействия цитоплазматических доменов с мембраной, вызывает активацию тирозинкиназ. В соответствии с другой, полярная боковая цепь способна образовывать межмолекулярные водородные связи в мембране, тем самым усиливая общую димеризацию рецептора, что приводит к спонтанной активации [511]. Объяснение влияния таких мутаций на активность белков возможно только при одновременном анализе пространственной структуры и энергии димеров ТМД дикого типа и мутантных форм.

Свойство "полярных мутаций" активировать РТК было использовано в настоящей работе для изучения структуры рецептора VEGFR2. Был применён оригинальный подход глутаматного

сканирующего мутагенеза, когда все остатки ТМД рецептора заменялись поочерёдно на Glu и проводилось измерение активации белка по уровню фосфорилирования конкретных а.о. При этом исследования проводились на двух конструкциях - полноразмерном белке и белке с делетированным внеклеточным доменом - VEGFR2fl и VEGFR2-ΔECD. Как оказалось, точечные замены на Glu способны активировать только последнюю конструкцию, при этом наиболее активным оказался вариант V769E. С другой стороны, были найдены двойные мутанты, в которых две аминокислоты с шагом в 7 остатков (~2 витка α-спирали) заменялись на глутамат, что приводило к лиганд-независимой активации полноразмерного белка. В этой связи, было проведено исследование трёх вариантов ТМД VEGFR2 - белка дикого типа, VEGFR2tm; мутанта V769E, VEGFR2tmV769E и двойного мутанта VEGFR2tmG770E/F777E. Для каждого из белков было выполнено исследование структуры димера и измерена свободная энергия димеризации в мицеллах DPC.

В первую очередь было показано, что структура ТМД никак не изменяется из-за включения одной или двух глутаминовых кислот. По данным ЯМР, все три белка характеризовались идентичной вторичной структурой (α-спираль без изломов в регионе 762-790, 760-790 в случае двойного мутанта, Рис. 86). Более того, боковые цепи ТМ остатков оказались не заряжены при нейтральных pH: pKa Glu769 составило 7.4, а Glu770 и Glu777 не депротонировались вплоть до pH 7.5, однако при более высоких pH происходил резкий кооперативный переход. В реальных мембранах, в присутствии 10-20% анионных липидов pKa Glu должно повысится ещё сильнее, исключая присутствие заряженной аминокислоты внутри клеточной мембраны. Таким образом, в данном конкретном случае гипотеза (1) оказывается неверна.

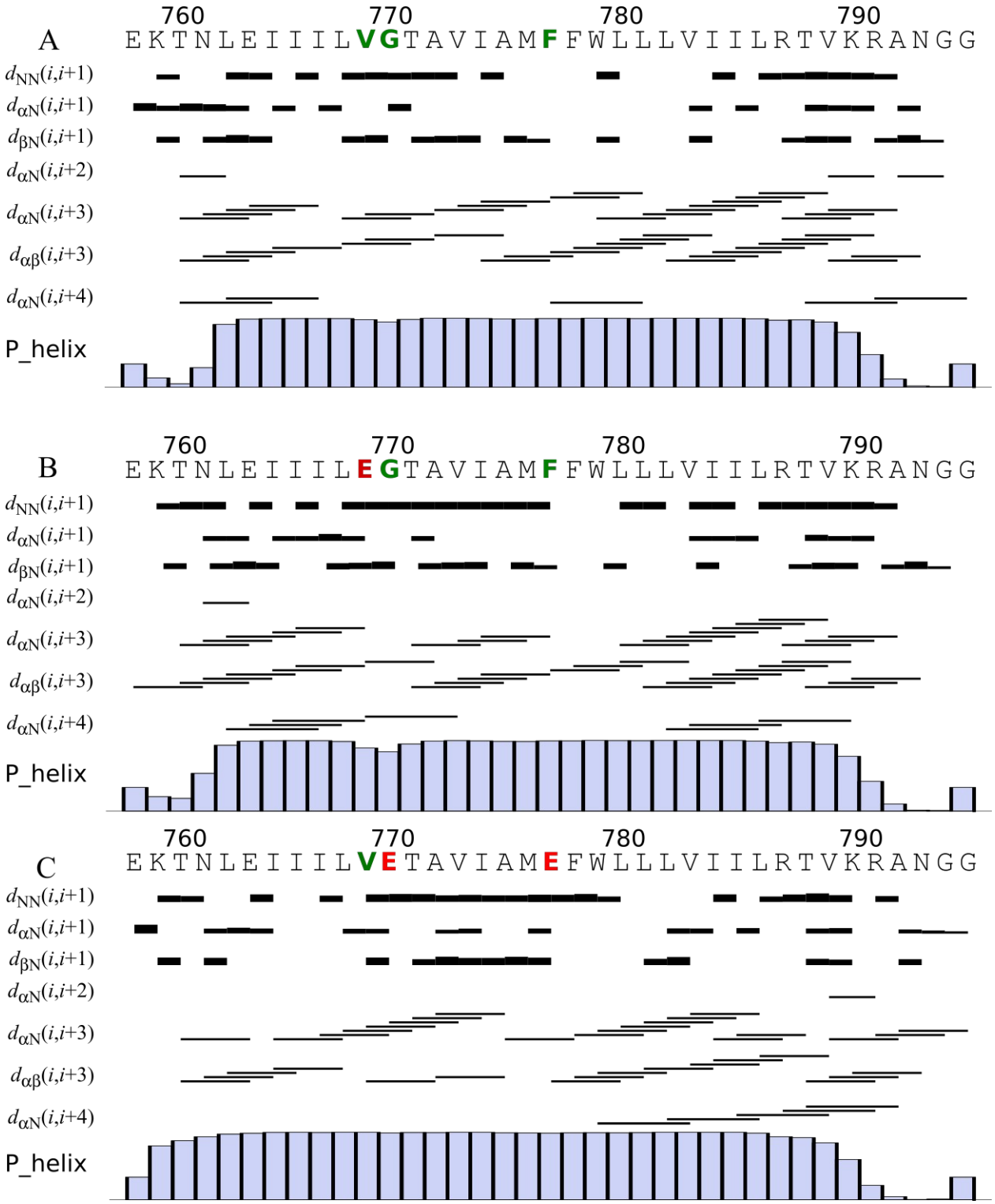

Рисунок 86. Распределение характерных контактов ЯЭО, а также вероятность α-спиральной конформации по вторичным химическим сдвигам, обработанным в программе TALOS-N [343], для VEGFR2tm (**A**), VEGFR2tmV769E (**B**) и VEGFR2tmG770E/F777E (**C**).

Анализ ЯМР-спектров белков показал, что в то время как белок дикого типа и двойной мутант VEGFR2tm образовывали две формы, мономер и димер, белок с заменой V769E мог

образовывать три состояния - мономеры, димеры и симметричные тримеры. При этом структуры димеров VEGFR2tmV769E и VEGFR2tm идентичны, что следует из анализа изменений химических сдвигов амидных групп (Рис. 87). С другой стороны, структура димера двойного мутанта значительно отличалась от структуры белка дикого типа, при сходстве общей геометрии димера (угол между осями спиралей, расстояние между спиралями) интерфейс димеризации оказался на противоположной стороне ТМ сегмента. Для всех трёх пептидов были проведены эксперименты по разбавлению мицеллами DPC, что позволило измерить свободную энергию димеризации и тримеризации белков. Оказалось, что VEGFR2tm образует димер с ΔG_0=-4.6±0.2 ккал/М, VEGFR2tmV769E - -4.9±0.2 ккал/М, а VEGFR2tmG770E/F777E - -5.8±0.3 ккал/М. При этом энергия тримеризации VEGFR2tmV769E составила -5.5±0.2 ккал/М. Таким образом, мутация V769E не изменяет существенно структуру и стабильность димера ТМД, однако стабилизирует дополнительный тип взаимодействия между ТМД белка - асимметричный, который выражается в появлении чрезвычайно стабильной тримерной формы. Соответственно, активация VEGFR2 с делетированным внеклеточным доменом возникает не из-за усиления димеризации, а благодаря изменению характера взаимодействия между ТМД, что, судя по всему, приводит к увеличению вероятности образования активного состояния димера киназных доменов. Двойная мутация G770E/F777E приводит к стабилизации димерной формы на 1 ккал/М, а также к изменению структуры димера ТМД белка. Вероятнее всего, оба фактора в ответе за активацию полноразмерного VEGFR2. Приведённый пример показывает, что измерение свободной энергии значительно расширяет возможности при изучении механизма действия точечных мутаций. Совместный анализ структур и их стабильности позволяет заключить, что "полярные мутации" не просто стабилизируют димер белка, но меняют структуру димера таким образом, что становится возможной активация внутриклеточных доменов. В дальнейшем подобный вывод был сделан при исследовании ТМД FGFR3 и Neu методом FRET [509,512].

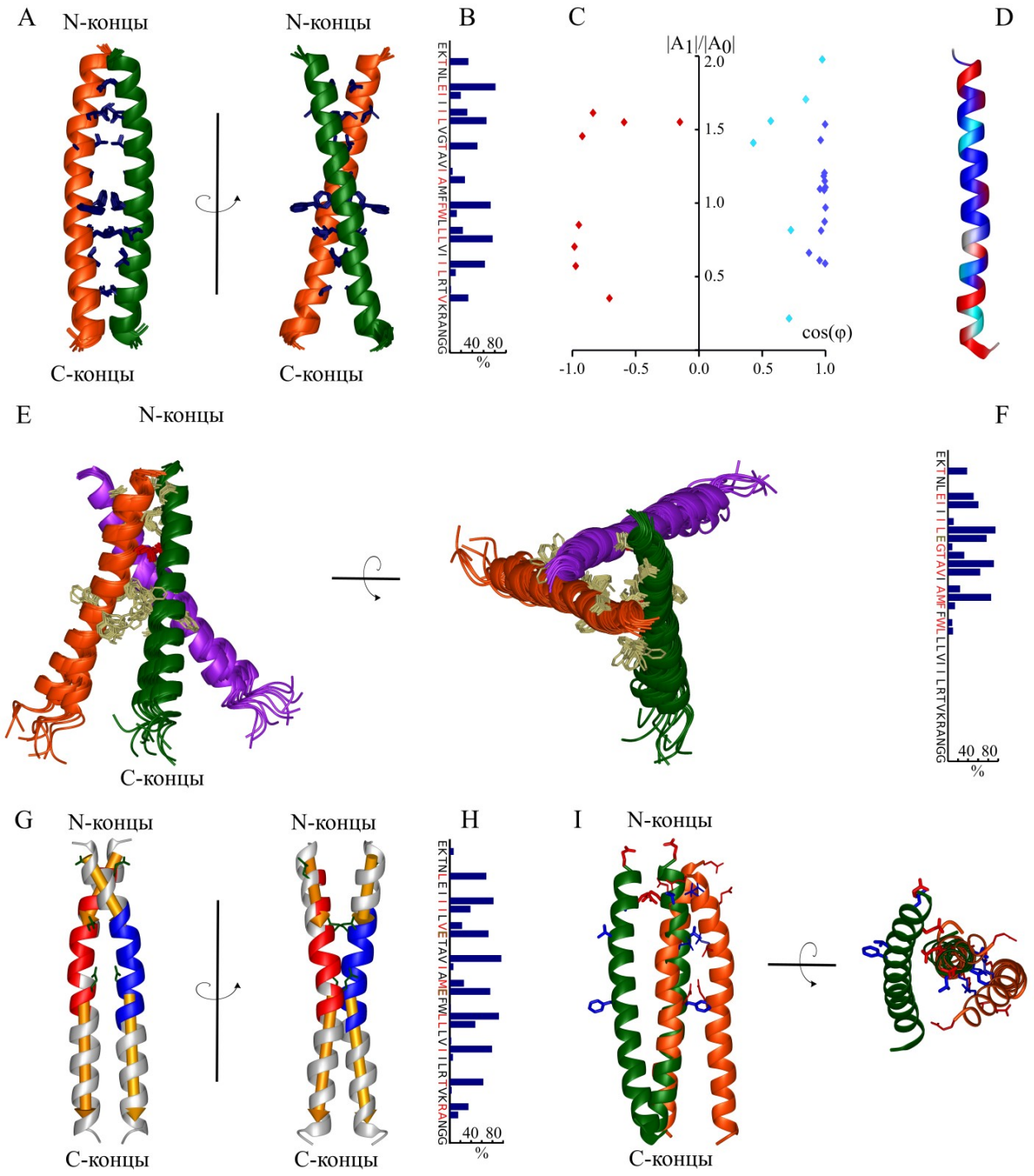

Рисунок 87. **A,E,G** - пространственные структуры димераVEGFR2tm, тримера VEGFR2tmV769E и димера VEGFR2tmG770E/F777E. **B,F,H** - доля поверхности остатков на интерфейсе димеризации/тримеризации. **C,D** - анализ ковариации изменений химических сдвигов NH при димеризации ТМД дикого типа и мутантной формы V769E. |A1|/|A0| - отношение изменений обобщённого химического сдвига, cos(φ) - косинус угла между векторами, характеризующими смещение сигналов в спектре HSQC. ТМ α-спираль на панели **D** окрашена, в соответствии с результатами анализа ковариаций (**C**). **I** - суперпозиция структур димеров VEGFR2tm и VEGFR2tmG770E/F777E. Структуры совмещены по атомам основной цепи одной из α-спиралей.

6.4.2. Изучение влияния окружения на стабильность и структуру димеров МБ

Вторым важным аспектом поведения МБ, для изучения которого необходимо исследовать свободную энергию взаимодействия между ТМ спиралями, является влияние свойств мембранного окружения. Активация многих клеточных рецепторов так или иначе сопряжена с миграцией между микродоменами клеточной мембраны. Так, некоторые TLR при активации оказываются в рафтах клеточной мембраны [180], а рецептор EGFR локализуется в рафтах только в лиганд-связанной форме [513]. Иными словами, свойства мембранного окружения могут влиять на функциональное состояние белка, или наоборот. С другой стороны, **Бочаровым Э.В.** была предложена концепция липид-опосредованной активации некоторых РТК. Согласно этой теории, изменение свойств липидного бислоя, происходящее вследствие взаимодействий растворимых доменов белков с клеточной мембраной, может управлять структурой ТМ домена, которая, в свою очередь, управляет активностью внутриклеточных киназ. Таким образом, исследование влияния параметров липидного окружения на структуру и стабильность димеров ТМД клеточных рецепторов может прояснить ряд аспектов функционирования полноразмерных рецепторов. Более того, такие работы важны для понимания базовых физических принципов, определяющих стабильность нативной укладки α-спиральных МБ.

Можно выделить три основных параметра липидного окружения, которые могут неспецифически влиять на свойства МБ - толщина бислоя, фазовое состояние (ж.-к. или жидко-упорядоченная фаза) и заряд. Как было показано выше, жидко-упорядоченную фазу невозможно воспроизвести в мембраноподобных средах, которые применяются для ЯМР-спектроскопии высокого разрешения, а заряд мембраны вряд ли существенно отличается между микродоменами и основной частью клеточной мембраны. При этом, толщину бислоя можно легко варьировать в малых изотропных бицеллах (раздел 4.11.2), частицы сохраняют идеальное поведение и доступны параметры бицелл для решения уравнения (31). Иными словами, можно изучать влияние толщины бислоя на структуру и стабильность димеров ТМД с использованием изотропных бицелл с варьируемым липидным составом. Для целей данной работы подобное исследование было проведено на белке HER4tm, который является удобным модельным объектом для измерения свободной энергии димеризации ТМД в бицеллах. Белок был встроен в бицеллы DLPC/CHAPS, DMPC/CHAPS, DPPC/CHAPS и POPC/CHAPS с q=0.5. Таким образом, варьировалась толщина бислоя (от 12 до 16 атомов углерода в ацильных цепях) и параметры упаковки (POPC содержит ненасыщенную жирную кислоту). Для всех четырёх образцов были

получены гетероядерные спектры ЯМР и проведены эксперименты по серийному разбавлению раствором бицелл, которые затем обрабатывались с использованием методики из раздела 6.2.2. Оказалось, что влияние толщины бислоя на структуру димера HER4tm минимально - характер "двоения" сигналов одинаков во всех условиях (Рис. 88). С другой стороны, стабильность димеров менялась существенным образом. Если в DMPC наблюдалась самая слабая димеризация, ΔG_0=-1.2±0.2 ккал/М, то в DLPC энергия существенно уменьшилась, до -3.2±0.1 ккал/М, в DPPC - до -2.1±0.1 ккал/М, в POPC - до -2.8 ккал/моль. Проведённые измерения являются первым в мире исследованием влияния толщины бислоя на энергию димеризации реального, а не искусственно созданного МБ, в результате которого были получены точные значения параметра ΔG_0.

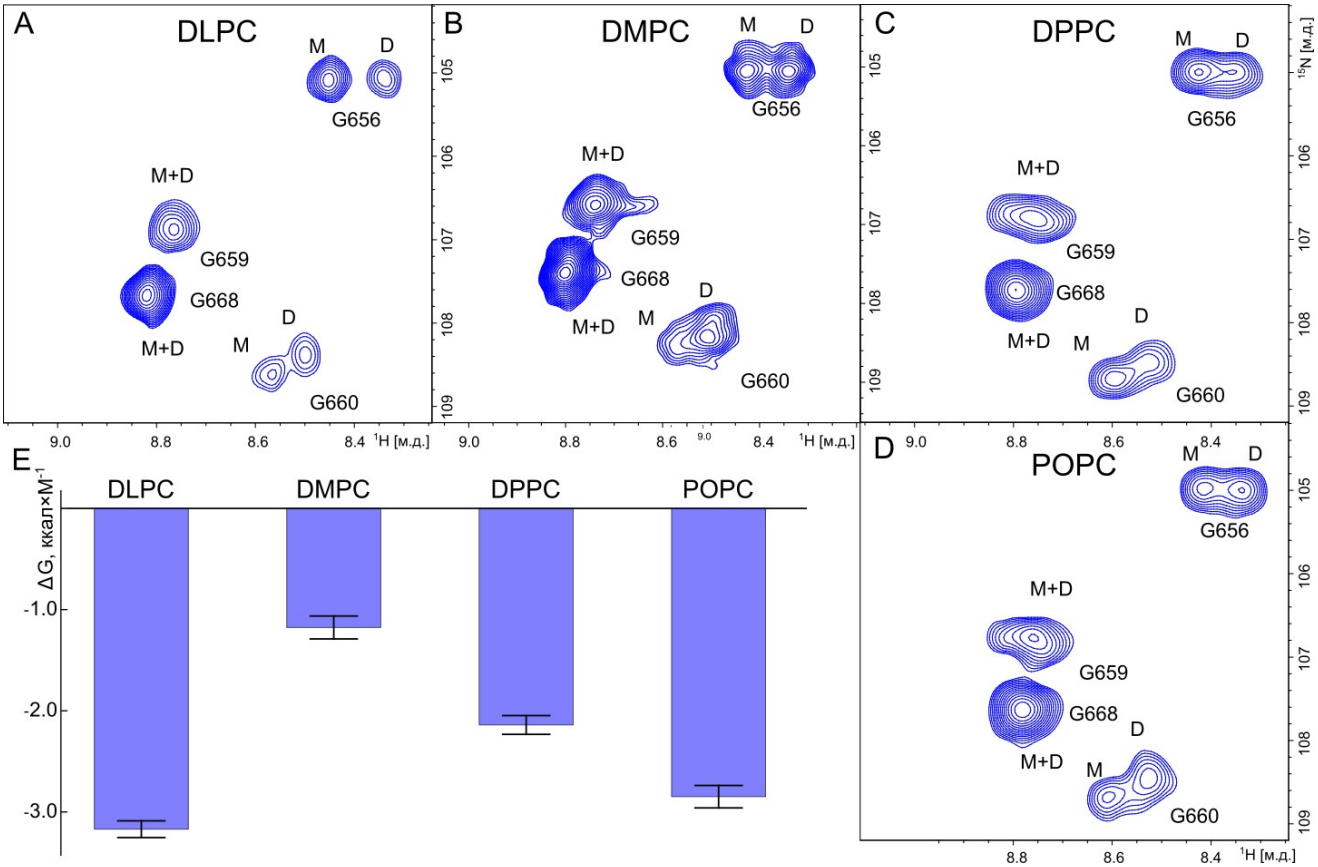

Рисунок 88. A-D - фрагменты спектров ^{1}H,^{15}N-TROSY-HSQC белка HER4tm в бицеллах на основе CHAPS, приготовленных с использованием различных фосфолипидов при q=0.5, 30 ºC, pH 6.0. **E** - свободные энергии димеризации HER4tm в бицеллах на основе CHAPS, приготовленных с использованием различных фосфолипидов при q=0.5.

Таким образом, стабилизация димера ТМД за счёт незначительного (на два звена ацильной цепи) изменения длины молекулы липида может достигать 2 ккал/М, больше чем от мутации V/E, при том что боковая цепь Glu способна образовывать водородные связи. Иными

словами, проведённая работа показывает, что липидный состав и состояние мембраны - важнейший фактор, определяющий состояние димера ТМД. Несмотря на то, что структура димера HER4tm не изменилась в результате эксперимента, отличие в 2 ккал/моль показывает принципиальную возможность конформационного перехода, управляемого липидным составом, в том случае, если существует близкое по энергии состояние димера ТМД, стабильность которого по-другому зависит от толщины бислоя.

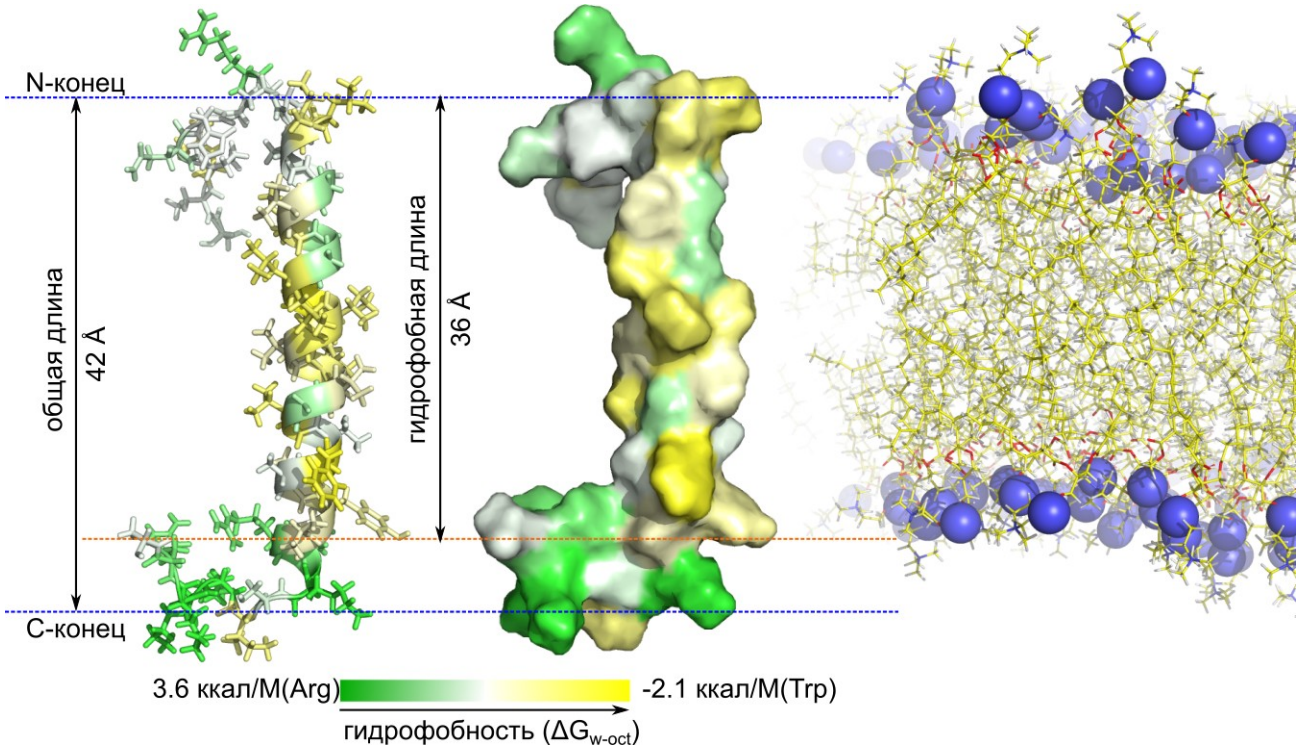

Рисунок 89. Гидрофобные свойства ТМ домена HER4tm. Структура HER4tm окрашена в соответствии с гидрофобностью аминокислот по шкале Уайта и Уимли [502]. Для сравнения, в масштабе приведено изображение фрагмента липидного бислоя DMPC, полученное методами компьютерного моделирования.

Отдельный интерес представляет физическое объяснение наблюдаемой стабилизации/дестабилизации димерной формы белка в различных типах бицелл. Чтобы понять, какие базовые взаимодействия отвечают за зависимость энергии димера от толщины бислоя, в лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН был проведён компьютерный эксперимент по измерению свободной энергии димеризации HER4tm в бислоях DLPC, DMPC и DPPC с использованием метода "потенциала средней силы" [514]. Оказалось, что результаты измерений в бицеллах коррелируют с результатами моделирования. Несмотря на то, что величины ΔG_0 различались, общая закономерность сохранялась - наиболее стабильный димер образовывался в бислое DLPC, наименее - в бислое DMPC. Структура димера меняется

незначительно, общий интерфейс димера сохраняется. Следует сказать, что в настоящий момент зависимость энергии спираль-спирального взаимодействия от толщины бислоя объясняется двумя причинами, которые с определённой точки зрения представляют собой одно и то же явление. Первая причина - "гидрофобное несоответствие" [515]. Предполагается, что несоответствие толщины гидрофобной части бислоя и длины неполярной части ТМ сегмента является невыгодным. Поэтому, чтобы скомпенсировать разницу, белок может наклониться к нормали бислоя или образовать димер. Вторая причина - "липофобный эффект", аналог гидрофобного эффекта в неполярном окружении [516]. Если состояние липидов вокруг белка невыгодно (вероятнее всего из-за понижения энтропии системы), то белок будет стремиться минимизировать площадь поверхности контакта с липидами, в том числе за счёт димеризации. Очевидно, что гидрофобное несоответствие может вызывать липофобный эффект. С точки зрения гидрофобного несоответствия, полученные результаты нельзя назвать очевидными. Согласно теории, максимум энергии димеризации должен соответствовать липиду, бислой которого по толщине совпадает с длиной гидрофобной части α-спирали. В случае HER4tm это должен быть DMPC, в котором наблюдается слабейшая димеризация ТМД. При этом, толщина гидрофобной части DMPC всего 26 A, а длина гидрофобной части ТМ спирали составляет 36 A, что скорее соответствует среднему расстоянию между атомами фосфора. С другой стороны, при использовании компьютерного моделирования несоответствие должно выражаться в наклоне мономера белка относительно нормали бислоя или в уменьшении угла скрещивания спиралей в димере. Согласно данным компьютерного моделирования, углы наклона мономера одинаковы в рамках погрешности для трех бислоев, а угол скрещивания спиралей димера минимален в DPPC, а не в DMPC. Таким образом, "гидрофобное несоответствие" никак не объясняет наблюдаемые изменения свободной энергии димеризации в зависимости от толщины бислоя.

Липофобный эффект оценить несколько сложнее - для этого нужно измерить вклад взаимодействия белка с окружением в свободную энергию димеризации, а также изменение энтропии окружения при димеризации. Как оказалось, общий вклад взаимодействия белок/окружение никак не коррелирует со свободной энергией димеризации, так же как и изменение упорядоченности липидного бислоя, которое можно интерпретировать как изменение энтропии. Таким образом, все попытки объяснить зависимость стабильности структуры димера от параметров бислоя понятными и простыми эффектами не увенчались успехом. По всей видимости, в каждом конкретном случае невыгодность контактов с окружением компенсируется незначительными изменениями локальной структуры белка, а общая стабильность получается

как разница на порядок превышающих значение свободной энергии вкладов от различного рода взаимодействий белок/белок и белок/окружение.

6.4.3. Анализ сложного равновесия олигомерных форм ТМД

Третьей важной задачей, которую можно решить с использованием методики измерения свободной энергии и "мицеллярной" модели равновесия является определение различных олигомерных форм белка, одновременно присутствующих в образце. Как уже было сказано в разделе 5.1, доказательство димеризации или олигомеризации, желательно несколькими различными методами, является необходимой предварительной стадией при исследовании структуры олигомера МБ. В случае растворимого белка чаще всего применяют такие методы как динамическое или многоугловое светорассеяние, малоугловое рассеяние нейтронов или рентгеновских лучей, чтобы по среднему гидродинамическому радиусу или радиусу гирации определить молекулярную массу и агрегационное число комплекса. Однако, все эти методы работают в случае монодисперсных растворов и могут приводить к ошибкам в случае одновременного присутствия нескольких олигомерных форм. Более того, в случае образцов МБ для ЯМР-спектроскопии, невозможно конвертировать напрямую гидродинамический радиус в агрегационное число, поскольку первый включает себя размер частицы мембраноподобной среды, который сам по себе неизвестным образом зависит от олигомерной формы белка.

Поэтому для указанных целей часто используют кросс-сшивающие реагенты и гель-электрофорез [517], но способность такого эксперимента адекватно описывать равновесие олигомерных состояний белка вызывает большие сомнения. Дело в том, что кросс-сшивающие реагенты фиксируют олигомерную форму, независимо от заселённости состояния, более того, количество олигомера будет накапливаться на протяжении реакции, а скорость накопления зависит не от содержания данной конкретной формы, а от константы скорости олигомеризации. Таким образом, единственным достоверным способом подтвердить олигомерное состояние белка является анализ зависимости заселенностей состояний от концентрации общего белка и "пустых" мицелл/бицелл.

Стандартной схемой эксперимента представляется постепенное разбавление начального образца концентрированным раствором мембраноподобной среды. При этом отслеживается заселённость форм, а зависимость заселенностей от [micE] анализируется с применением различных форм уравнения (28) в логарифмической шкале (27). Однако, первые же

эксперименты, проведённые на белке VEGFR2tmV769E показали, что для обеих опробованных моделей равновесия трёх форм (мономер-димер-тример и мономер-димер-тетрамер) экспериментальные точки ложились на линейную зависимость (27), в которой от выбора модели изменялся только параметр γ. Изгибов зависимости не наблюдалось. Таким образом, при подобной постановке эксперимента единственным критерием должно быть значение параметра γ, точнее близость параметра к "идеальной" величине n-1, где n- число взаимодействующих мономеров белка. Тем не менее, учитывая значение γ в ряде доказанных случаев димеризации (например γ=2.2 для HER3tm), предложенный критерий не выдерживает критики.

Проблему линейности зависимости ΔG_{app}(ln[micE]) для неверных моделей олигомеризации удалось решить изменением схемы эксперимента. Оказалось, что если чередовать постепенное разбавление мицеллами с резким 2-3 кратным разбавлением водным буфером, то точки, полученные после такого резкого разбавления, окажутся на одной прямой с точками, полученными до разбавления, только для правильной модели процесса олигомеризации. На рисунке 90 отчётливо видно, что все экспериментальные точки образуют линейную зависимость, в предположении, что наблюдаемое равновесие - соответствует переходам мономер-димер-тример, однако для двух других проверенных гипотез, мономер-димер1-димер2 и мономер-димер-тетрамер, общая зависимость для всех точек не наблюдается.

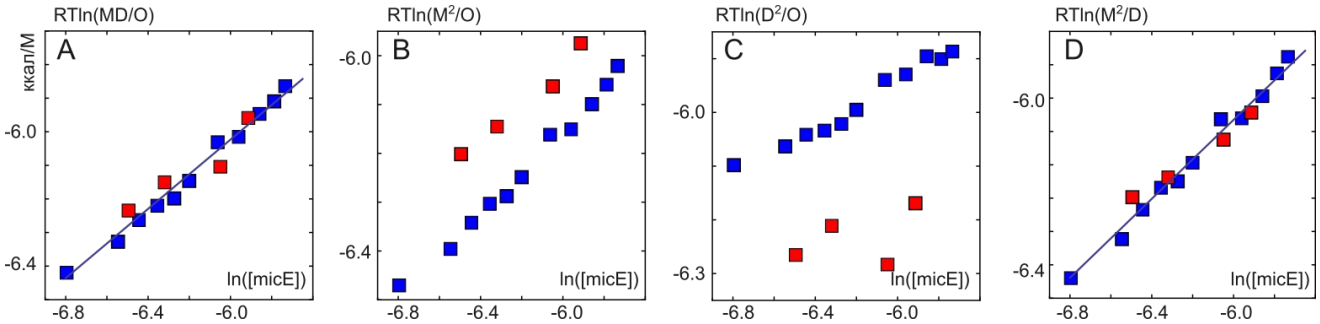

Рисунок 90. Зависимость ΔG_{app}(ln[micE]), построенная для различных моделей олигомеризации VEGFR2tmV769E - Мономер/димер/тример (**A,D**), мономер/димер/димер (**B,D**) и мономер/димер/тетрамер (**C,D**). Красные точки получены после трехкратного разбавления образца буферным раствором. M,D и O соответствует концентрации мономера, димера и олигомера белка.

Дополнительно, информацию об олигомерных формах можно получить на основании скорости вращательной диффузии. Анализ времён корреляции вращательной диффузии (t_c), проведённый для 13 различных ТМД в мицеллах DPC, показывает, что в этой мембраноподобной среде можно однозначно определить олигомерную форму ТМД

ориентируясь на величину t_c. Поскольку измерения проводились при разных температурах, значения t_c конвертировались в гидродинамические радиусы частиц с белком по закону Стокса. Оказалось, что радиус частиц с одной ТМ α-спиралью составляет 2.59±0.08 нм, с двумя ТМ α-спиралями - 2.79±0.06 нм, с тремя спиралями - 3.01 ±0.05 нм. Различие велико и статистически значимо ($p<0.001$). Таким образом, каждая α-спираль добавляет в среднем 0.2 нм к гидродинамическому радиусу мицеллы. К сожалению, такая статистика доступна исключительно в мицеллах DPC. В других детергентах измерения не приводились, а в бицеллах DMPC/DHPC, как было показано на примере TrkA в главе 4, характер взаимоотношения между вращательной диффузией белка и размером частицы не выявляется.

Резюмируя, сформулируем базовые требования к образцу, на основании которых можно наверняка заключить о наличии олигомеризации белка в мицеллах детергента:

1. В спектрах ЯМР должны наблюдаться два или более набора сигналов
2. Относительная интенсивность сигналов должна зависеть от соотношения белок/липид
3. Зависимость заселенностей состояний от концентрации пустых мицелл должна описываться уравнением (28).
4. Кросс-пики амидных групп в спектрах ЯМР должны характеризоваться различной скоростью вращательной диффузии.

Данные критерии нельзя применять в случае быстрого обмена между олигомерными формами, который может наблюдаться в бицеллах при определённых условиях. Тогда, химические сдвиги сигналов должны зависеть от соотношения липид/белок, и необходимо проводить дополнительные контрольные эксперименты ЯМР с гетероядерной фильтрацией, для подтверждения наличия олигомерной формы. Определить агрегационное число комплекса на основе данных ЯМР при этом не представляется возможным.

6.4.4. Взаимосвязь структура-энергия

Наконец, помимо применения методики измерения свободной энергии димеризации МБ в исследованиях, связанных с механизмом функционирования различных белков, подход позволяет получить данные, необходимые для установления взаимосвязи между структурой и энергией димеров ТМ α-спиралей. В свою очередь, такая взаимосвязь необходима для развития методов предсказания *in silico* структур α-спиральных МБ. На настоящий момент полуэмпирические потенциалы, используемые в компьютерных экспериментах недостаточно точны, чтобы получать корректные структуры МБ в липидном окружении и требуют улучшения.

Так, например, программа TMDOCK позволяет получить несколько близких по "энергии" моделей димеров ТМД белков, при этом одна из моделей соответствует экспериментальной, в то время как другие - не реализуются [477]. Более того, для некоторых белков не удаётся получить ни одной структуры, соответствующей экспериментальной. Значения свободной энергии взаимодействия между ТМ спиралями, полученные в компьютерных экспериментах, коррелируют с измеренными различными методами *in vitro*, но при этом существенно от них отличаются [518]. Таким образом, одновременное определение пространственной структуры димера ТМД и свободной энергии его диссоциации позволит получить информацию, необходимую для калибровки констант различных типов взаимодействий в мембранном окружении.

Таблица 11. Значения свободной энергии димеризации, полученные для ряда ТМД с использованием методик главы 6.

ТМД	**Окружение**	**ΔG_0, ккал/М[а]**	**Мотив димеризации**	**ссылка**
HER3tm	DPC	-0.2	гидрофобный[б]	[467]
HER4tm	DMPC/CHAPS	-1.2	гликофориновый	[519]
HER4tm	DLPC/CHAPS	-3.2	гликофориновый	[519]
VEGFR2tm	DPC	-4.6	гидрофобный	[468]
*EGFRtm**	DPC	-1.2	гликофориновый	[471]
TLR3tm	DPC	-1.8	полярный остаток[в]	[520]
TrkAtm	DPC	-2.1	гидрофобный	неопубл.
*FGFR3tm**	DPC/SDS 9:1	-1.0	гидрофобный	[521]
VEGFR2tmV769E	DPC	-4.9	полярный остаток	[468]
VEGFR2tm2mut	DPC	-5.8	полярный остаток*2	[468]
p75tm	DPC	-0.9	гидрофобный	[522]
p75C257A	DPC	-1.8	гидрофобный	[522]

[а]Приведены значения при стандартных условиях, соответствующих 1М детергента в пустых мицеллах.
[б]Протяженный мотив с преимущественно гидрофобными остатками на интерфейсе.
[в]Структуры, где взаимодействие стабилизируется полярной боковой цепью в ТМ сегменте.
*Структуры, для которых измерения проводились без участия автора данной работы

В этой связи, для большинства белков, структуры димеров которых были определены в лаборатории автора, были параллельно измерены значения свободной энергии. Полученные данные представлены в Таблице 11.

Таким образом, удалось получить значения свободной энергии димеризации для 11 пространственных структур ТМД. Данный набор не является достаточным для установления искомой взаимосвязи, однако позволяет сделать ряд заключений. Во-первых, очевидно, что роль гликофориновых мотивов сильно переоценена. В настоящее время считается, что такие мотивы являются основной движущей силой взаимодействия ТМ α-спиралей в белках, однако не наблюдается принципиально повышенной стабильности структур, образованных с их участием. Наиболее стабильными являются структуры ТМД, в которых на интерфейсе димеризации обнаруживаются полярные боковые цепи, такие как Asn в TLR3tm или Glu в случае мутантов VEGFR2tm. При этом, самый стабильный димер ТМД дикого типа, образуется в случае VEGFR2. В димеризации данного белка основную роль играют ароматические остатки и неполярные объёмные боковые цепи, образующие множественные взаимодействия Ван-дер-Ваальса. То есть, взаимодействия между неполярными боковыми цепями вносят вклад не менее существенный, чем полярные контакты и неканонические водородные связи в гликофориновых мотивах. Во-вторых, недооценивается влияние липидного окружения. Изменение длины ацильных цепей липидов на два звена позволяет превратить сравнительно слабый димер HER4tm в один из самых стабильных. Иными словами, липидное окружение - важнейший фактор, определяющий структуру и энергию ТМД белков, а для точного предсказания структуры МБ необходимо понимать, как уравновешиваются вклады различных типов взаимодействий между белками и молекулами липидов.

6.5. Преимущества и недостатки предложенных подходов

Для понимания границ применимости и преимуществ предложенного подхода необходимо рассмотреть другие схожие методы, например АУЦ, FRET и титрационную калориметрию, которые подробно описаны в главе 2. Основным преимуществом разработанных методик является возможность одновременного наблюдения структуры белка и измерения свободной энергии его димеризации, в рамках одного и того же эксперимента. В случае калориметрии, FRET и АУЦ регистрируется всего лишь один параметр, а именно - суммарное выделение тепла, среднее расстояние между донором и акцептором флуоресценции или средняя "плавучая" масса комплекса. При использовании ЯМР отдельно регистрируется концентрация различных по структуре олигомерных форм белка. Это позволяет избежать необходимости

учитывать вероятность случайного сближения молекул, а также исследовать слабые димеры с энергией выше -1.5 ккал/моль, что невозможно сделать другими методами. С другой стороны, благодаря раздельному измерению заселённостей состояний можно изучать сложные равновесия между несколькими олигомерными формами объекта, что затруднено при использовании других подходов, когда одну измеряемую величину необходимо описать сложным выражением с множеством параметров. По той же причине применение методики чрезвычайно удобно при изучении влияния окружения и точечных мутаций - можно разделить вклады окружения и изменения пространственной структуры. Наконец, измерения при помощи ЯМР не требуют химической модификации объектов исследования.

Недостатки подхода также лежат на поверхности, и, в первую очередь, это связано с различными ограничениями инструментального метода. Спектроскопия ЯМР характеризуется низкой чувствительностью, поэтому требуются значительные количества образца, для проведения измерений необходимо произвести не менее двух милиграммов белка, меченого стабильными изотопами азота. По той же причине нельзя изучать МБ, образующие слишком стабильные димеры, которые распадаются только при подавляющем избытке липида. Концентрация липида в образце ограничена 10%, при более высоких значениях начинают существенно ухудшаться спектры из-за ускорения поперечной релаксации. Поэтому, имея ограничение снизу по концентрации белка из-за чувствительности и ограничение сверху по концентрации липидов из-за релаксации, работы при помощи ЯМР можно проводить в сравнительно узком диапазоне соотношений LPR - от 60 до 3000. В случае, если при LPR 3000 димер не диссоциирует, его энергию димеризации невозможно измерить, в отличие от других методов, которые гораздо чувствительнее и лучше приспособлены к изучению стабильных димеров вроде гликофорина А. Основным недостатком подхода является ограничение по массе объекта, что делает невозможной работу в наиболее адекватных мембраноподобных средах. Измерения при помощи ЯМР можно проводить исключительно в мицеллах и малых бицеллах, в то время как при помощи FRET можно изучать взаимодействия между белками в липосомах и даже в мембранах живых клеток [523]. Дополнительно, ограничение по размеру затрудняет работу с крупными МБ, однако данную проблему можно преодолеть при использовании селективного протонирования метильных групп, с сопутствующим значительным увеличением стоимости образцов.

Тем не менее, несмотря на указанные недостатки, методика показала исключительную полезность при работе с небольшими белками, которые могут образовывать несколько олигомерных форм, в особенности с односпиральными ТМД клеточных рецепторов.

6.6. Заключение

Резюмируя главу 6 можно сделать следующие выводы:

1. Были разработаны методики для измерения заселенностей олигомерных форм МБ по двумерным гетероядерным спектрам ЯМР, а также модели равновесия между олигомерными формами, учитывающие мицеллярную природу используемых мембраноподобных сред. При помощи указанных методик можно измерять свободную энергию взаимодействия МБ и изучать равновесную кинетику данного процесса. Показана применимость подхода в различных мембраноподобных средах - мицеллах детергента и липидных бицеллах. Предложен метод анализа сложных равновесий между несколькими различными олигомерными формами МБ, которые одновременно присутствуют в образце. Подход имеет ряд преимуществ перед другими методами на основе флуоресценции, калориметрии и центрифугирования.

2. При помощи разработанных методов был изучен ряд аспектов поведения односпиральных мембранных доменов МБ - влияние точечных мутаций, вызывающих лиганд-независимую активацию рецептора VEGFR2, а также влияние липидного состава окружения на стабильность димера ТМ домена HER4. Показано, что точечные замены неполярных аминокислот на Glu, которые приводят к спонтанной активации различных конструктов на основе VEGFR2, вызывают изменение конформации димера ТМД, которому сопутствует его стабилизация, или же приводят к активации дополнительных поверхностей для спираль-спирального взаимодействия, без стабилизации димера. Показано, что даже самые малые изменения в липидном окружении могут оказывать значительное влияние на стабильность димера ТМД, при сохранении его пространственной структуры.

3. С использованием предложенных подходов измерена свободная энергия димеризации 11 белков, что ляжет в основу набора экспериментальных данных для установления взаимосвязи между структурой и энергией α-спиральных МБ, необходимой для развития компьютерных методов анализа и предсказания пространственных структур МБ.

Глава 7. Методы исследования структуры крупных фрагментов клеточных рецепторов.

7.1. Формулировка подхода

Как уже было неоднократно упомянуто, основной проблемой при исследованиях структуры МБ является получение нативно свёрнутого образца белка в пригодной для изучения форме - кристалле, растворе мелких частиц мембраноподобной среды. Особые сложности возникают при изучении МБ с одним ТМ сегментом (МБ-1), таких как РТК или TLR. Эти белки содержат крупные внутри- и внеклеточные домены, но в мембране находится всего одна α-спираль. Из-за этого МБ-1 достаточно подвижны, что препятствует их кристаллизации, а также исследованиям методом крио-электронной микроскопии. На настоящий момент, наибольшим успехом, которого удалось достигнуть в области изучения структуры полноразмерных МБ-1, является структура рецептора PDGFR, полученная с разрешением в 2.7 нм [390]. Для сравнения, в таком разрешении весь ТМД белка будет соответствовать одному "пикселю" изображения. С другой стороны, глобулярные водорастворимые домены внутри и снаружи мембраны находятся в совершенно различном окружении, что в первую очередь касается окислительно-восстановительного потенциала [524]. Вне клетки остатки цистеинов образуют дисульфидные связи, в то время как в цитоплазме такие связи не возникают, а остатки цистеина формируют сайты связывания цинка или сайты для ацилирования.

В этой связи, все белки с одним ТМ сегментом исследуют, применяя подход "разделяй и властвуй", - белок разделяется на отдельные домены, разрешаются их пространственная структура, после чего предпринимаются попытки собрать модель полноразмерного рецептора в различных функциональных состояниях. Пример применения такого подхода можно увидеть в разделе 5.3, когда модель полноразмерного TLR4 была построена на основании данных о структуре отдельных доменов, полученных как при помощи ЯМР-спектроскопии, так и методами рентгеноструктурного анализа. Однако, несмотря на несколько случаев успешного использования, подход "разделяй и властвуй" сопряжён с рядом присущих ему недостатков, которые влияют на информационную наполненность результата. В первую очередь, необходимо понимать, что при исследовании "по частям" теряется информация о взаимосвязи между состояниями отдельных доменов. Например, имея структуры внеклеточного домена рецептора в активном и неактивном состояниях и некую структуру ТМ домена РТК, оказывается достаточно сложным поставить их во взаимное соответствие. Если какая либо точечная мутация вызывает

инактивацию белка, а сайт мутации находится на интерфейсе димеризации ТМД, это совершенно не означает, что полученная структура ТМД соответствует активному состоянию белка. Ведь разрушение неактивной димерной формы также может приводить к потере функциональности полноразмерного рецептора. Часто можно воспользоваться косвенной информацией, вроде расстояния между N-концами внутриклеточных доменов и C-концами внеклеточных, однако, в любом случае однозначного вывода сделать не удастся. С другой стороны, оперируя ограниченным набором состояний отдельных доменов мы теряем информацию о движениях, которые приводят к переключениям между отдельными конформациями. Ведь мишенью, для которой производится разработка лекарства, может быть не только основное низкоэнергетическое состояние белка, но и переходные формы.

С учётом всего сказанного выше в рамках данной работы предлагается рассмотреть использование спектроскопии ЯМР для изучения структуры и, что важно, - **динамики** крупных фрагментов МБ, для того, чтобы получить информацию о взаимосвязи между состояниями отдельных доменов объектов и о функционально значимых движениях молекул.

7.2. Конструкции, содержащие ТМ домены и примембранные регионы

Из-за ограничения на массу частиц при изучении структуры белков методами спектроскопии ЯМР в растворе, первыми объектами были избраны конструкты, содержащие трансмембранные домены и цитоплазматические примембранные регионы рецепторов EGFR, HER2, TLR4 и p75. Результаты исследования TLR4 приведены в главе 5, и белок можно исключить из списка, поскольку предполагаемый примембранный регион рецептора оказался частью его трансмембранного домена. Тем не менее, в случае других белков удалось достигнуть определённых результатов.

7.2.1. EGFR/HER

Как было упомянуто ранее, в ряде недавних работ было показано, что цитоплазматические примембранные регионы (ЦПР) EGFR/HER играют важную роль в активации рецепторов [406]. Условно ЦПР можно разделить на две части, ЦПР-А, который предположительно образует короткие α-спирали, и ЦПР-В, имеющий протяжённую структуру. При этом, мутации в ЦПР-А могут вызывать инактивацию рецепторов EGFR [406,525] и предположительно взаимодействуют между собой в активном состоянии, образуя антипараллельный димер [108]. В данной работе совместно с **Бочаровым Э.В.** было проведено

исследование структуры конструкций, содержащих ТМД и ЦПР-А EGFR и HER2 в различных мембраноподобных средах.

Белок ТМД-ЦПР-А EGFR (остатки 641-690) был встроен в мицеллы DPC и бицеллы DMPC/DHPC при различных q, в обоих типах сред было проведено отнесение сигналов в спектрах ЯМР, измерены скорости кросс-скорелированной релаксации NH и времена корреляции вращательной диффузии отдельных остатков. Полученные данные однозначно показывают, что в мицеллах цепь белка формирует две отдельные α-спирали, 646-670 и 676-686. При этом в бицеллах образуется только ТМ α-спираль, химические сдвиги ЦПР-А близки к характерным для конформации "неупорядоченный клубок" (Рис. 91). Это наблюдение подтверждается и динамическими характеристиками белка - в мицеллах наблюдаются два стабильных региона, разделённых сравнительно подвижной петлей, в то время как в бицеллах виден один медленный участок, в то время как подвижность С-концевых остатков постепенно увеличивается с расстоянием от ТМ домена. Можно увидеть, что подвижность ЦПР-А замедлена по сравнению с профилем τ_C, наблюдаемым на N-конце конструкта, но, даже если α-спираль и формируется, это - короткоживущая конформация, поскольку характерные контакты ЯЭО не наблюдаются. Анализ химических сдвигов в программе TALOS-N показывает, что вероятность α-спиральной структуры ЦПР-А в бицеллах составляет лишь 30%. Причём, спектры ЯМР не изменяются существенно при увеличении размера бицелл вплоть до q=0.8, а также при добавлении до 20% анионных липидов. По данным ЯМР был произведён расчёт пространственной структуры белка в мицеллах DPC (Рис.91), в полученных моделях спирали ЦПР и ТМД расположены под углом 90º, спираль ЦПР-А лежит на поверхности мицеллы, а неполярные боковые цепи Leu заглублены в липидное окружение. Таким образом, можно заключить, что в мицеллах ЦПР-А образуют амфифильные спирали на поверхности частицы, в то время как в бицеллах регионы в основном неупорядоченны с возможностью существования короткоживущего α-спирального состояния.

В спектрах ТМД-ЦПР-А EGFR наблюдались два набора сигналов в обоих окружениях. Интенсивность сигналов зависела от соотношения LPR, а сами сигналы характеризовались различной скоростью вращательной диффузии, что позволяет заключить об участии белка в димеризации. Димеризация в мицеллах оказывает особенно заметный эффект на ЦПР, их движения замедляются в среднем на 50%, в то время как движения ТМД замедляются всего на 17%. Иными словами, при димеризации усиливается сопряжение состояния ТМД и ЦПР-А. Для изучения структуры димера были измерены изменения обобщённого химического сдвига амидных групп при димеризации в DPC при pH раствора выше (5.8) и ниже (3.5) pKa

глутаминовых кислот, которыми изобилует ЦПР-А. Профиль изменений химических сдвигов показывает, что ТМД одинаково "чувствует" димеризацию при обоих условиях, в то время как сигналы ЦПР-А реагируют на димеризацию только, если боковые цепи глутаматов депротонированы. Следовательно, при pH 5.8 ЦПР-А каким-то образом участвуют в димеризации ТМД, что подтверждается изменением химических сдвигов сигналов участка в спектрах ЯМР. При этом, разрешить структуру димера не удалось из-за низкого качества спектра ЯМР с гетероядерной фильтрацией.

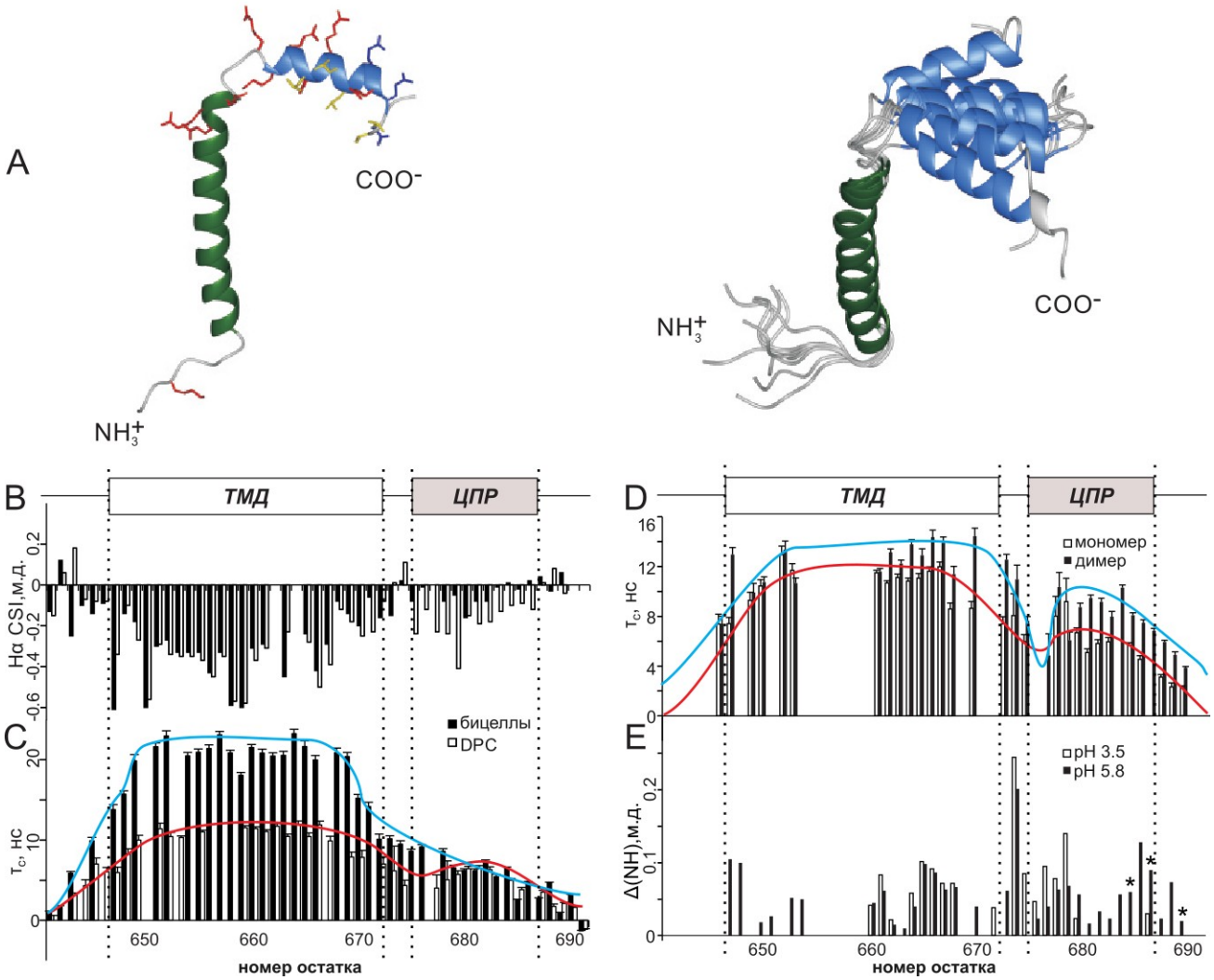

Рисунок 91. A - пространственная структура ТМД-ЦПР-А EGFR в мицеллах DPC при pH 3.6. Желтым, красным и синим приведены гидрофобные, положительно заряженные и анионные боковые цепи белка. **B,C** - распределение вторичных химических сдвигов протонов Hα и времен корреляции вращательной диффузии NH векторов белка в мицеллах (прямоугольники без заливки) и бицеллах (прямоугольники с заливкой). **D** - времена вращательной диффузии NH векторов EGFR в мономерной и димерной формах. **E** - Изменения обобщенного химического сдвига амидных групп при pH 3.5 (прямоугольники без заливки) и 5.8 (прямоугольники с заливкой).

В бицеллах DMPC/DHPC белок также испытывал переходы димер-мономер, происходящие в узком диапазоне LPR 60-80. Данный процесс не сопровождался значительными изменениями химических сдвигов, в отличие от мицелл DPC. Удалось выявить только 5 сигналов амидных групп с заметным "двоением", ни один из которых не принадлежит остаткам ЦПР. Можно заключить, что в бицеллах образуется слабый димер (ΔG0>-1 ккал/М), димеризация ТМД не вызывает значительных изменений в структуре α-спиралей и ЦПР. По-видимому, ЦПР никак не участвуют в димеризации конструкта.

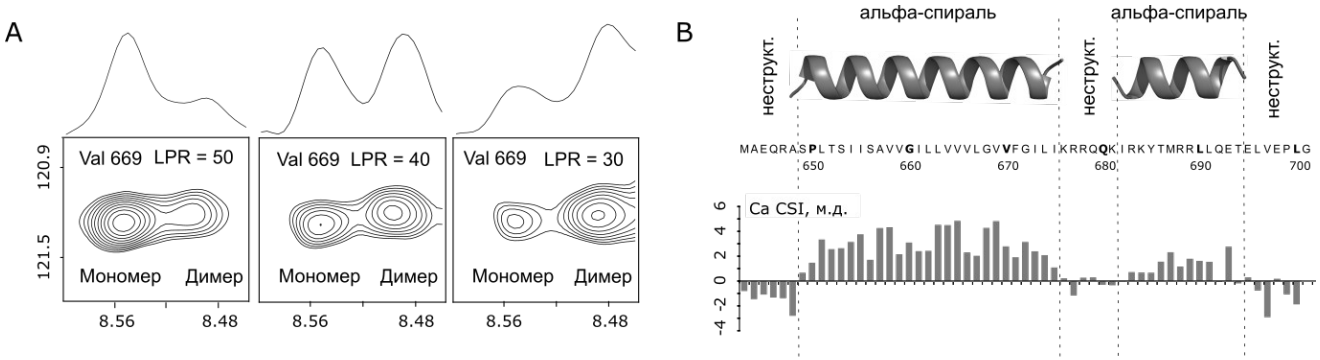

Рисунок 92. A - фрагменты спектров $^{1}H,^{15}N$-HSQC конструкции ТМД-ЦПР-А HER2, содержащие сигналы от остатка V669 в мономерной и димерной формах. Спектры получены при различных соотношениях DPC:белок (LPR). **B** - вторичные химические сдвиги $^{13}C\alpha$ остатков ТМД-ЦПР-А HER2. Положительные значения соответствуют α-спиральной конформации.

Схожая работа была проведена с фрагментом рецептора HER2, ТМД-ЦПР-А HER2. Исследовать указанный конструкт в бицеллах не удалось, из-за низкой стабильности образцов - при pH выше 5.0 белок выпадал в осадок, а при более низких значениях происходил быстрый гидролиз фосфолипидов. Поэтому, анализ структуры белка проводили только в мицеллах DPC. В данном окружении в спектрах ЯМР наблюдались два набора сигналов, соотношение интенсивностей зависело от LPR (Рис. 92). На основании времени корреляции вращательной диффузии можно заключить, что ТМД-ЦПР-А HER2 находится в равновесии между мономерной и димерной формой. Анализ химических сдвигов показывает, что белок формирует две α-спирали: ТМД (650-678) и ЦПР-А (683-696), связанные между собой неупорядоченной петлей. С использованием парамагнитного усиления релаксации от ионов Gd^{3+} в комплексе с хелатирующим агентом DOTA удалось показать, что ТМД и ЦПР-А экранированы от растворителя, в то время как петля между доменами экспонирована в водное окружение, что

дополнительно подтверждается профилем интенсивностей контактов ЯЭО между амидными группами белка и CH_2 группами детергента.

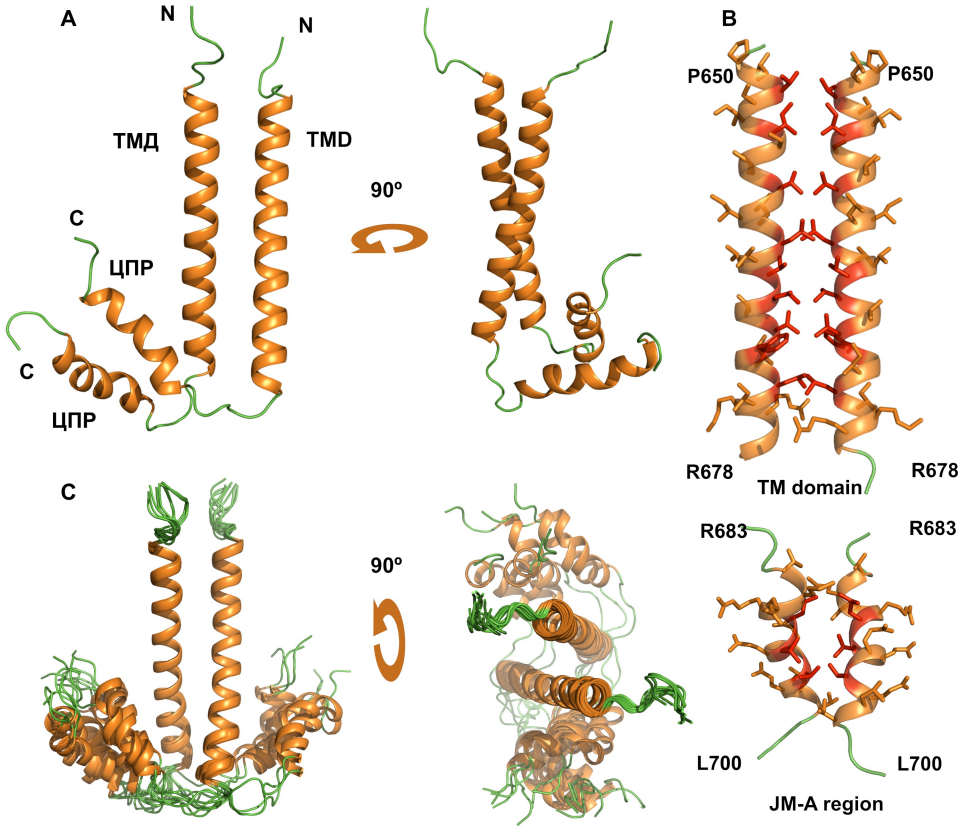

Рисунок 93. A - структура димера ТМД-ЦПР-А HER2 в ленточном представлении. **B** - увеличенное изображение димера ТМД и димера ЦПР с индикацией боковых цепей. Остатки на интерфейсе димеризации окрашены красным. **C** - суперпозиция 10 пространственных структур, полученных на основании данных ЯМР. Структуры совмещены по атомам основной цепи трансмембранных α-спиралей.

С использованием спектров ЯЭО с гетероядерной фильтрацией удалось зарегистрировать 14 межмолекулярных контактов, и была определена структура гомодимера белка, которая показана на рисунке 93. Как можно видеть, образуется параллельный правозакрученный симметричный димер с углом скрещивания α-спиралей 16º. При этом, взаимодействие ТМД осуществляется по протяжённому мотиву, состоящему преимущественно из неполярных остатков. Спирали ЦПР также образуют параллельный симметричный димер, на интерфейсе взаимодействия находятся остатки Leu, Thr и Met. Анализ полученной структуры показал, что наличие ЦПР существенным образом влияет на структуру димера ТМД, то есть состояния доменов взаимосвязаны. Описанная ранее структура димера ТМД HER2 в мицеллах DPC характеризовалась гораздо более высоким углом скрещивания α-спиралей: 50º (см раздел 5.3).

Иными словами, добавление цитоплазматических регионов к трансмембранному домену сказывается на результатах исследования структуры ТМД, с большой долей вероятности делая последнюю более нативной, что подчёркивает важность изучения крупных фрагментов МБ, содержащих несколько доменов. С другой стороны, наличие ЦПР позволяет проанализировать состояние ТМД в контексте механизма активации рецептора. По данным мутагенеза удалось показать, что в активном состоянии ЦПР должны образовывать антипараллельный димер, что соответствует большому расстоянию между С-концами ТМД [406]. В описываемой структуре С-концы ТМД сближены, а ЦПР взаимодействуют в параллельной ориентации, то есть найденная конформация димера конструкта ТМД-ЦПР-А соответствует неактивному димерному состоянию рецептора HER2.

7.2.2. Рецептор нейротрофина p75NTR

Значимая роль примембранных регионов может быть общей чертой большинства клеточных рецепторов с одним ТМ сегментом. В случае рецептора нейротрофинов p75NTR цитоплазматические примембранные регионы белка даже получили собственное название - домен "чоппер" (от англ. chopper, мясорубка). Как оказалось, даже небольшой части внутриклеточного домена p75NTR (домена "чоппер") достаточно, чтобы вызывать гибель нейронов [409]. Удивительно, но "чоппер" находится в области, для которой большинство биоинформатических инструментов предсказывает неупорядоченную структуру, в то время как глобулярный "домен смерти" можно удалить без потери этой части активности рецептора [410]. Более того, именно "чоппер" скорее всего взаимодействует с TRAF6, основным внутриклеточным белком, ответственным за запуск сигнальных путей при активации p75NTR. Классический механизм активации для рецептора p75NTR называется "щипцы для улиток", snail-tong, был предложен в 2009 году [401]. Согласно модели, в активном состоянии рецептор является ковалентным димером, в котором замкнута дисульфидная связь C257-C257, внеклеточные домены далеко друг от друга, а домены смерти образуют димер. Взаимодействие с лигандом приводит к димеризации внеклеточных доменов, что изменяет структуру димера ТМД и приводит к диссоциации димера внутриклеточных доменов смерти, которые оказываются доступны для адаптерных белков, которые запускают внутриклеточный каскад в ядро. При этом, структура как ТМД, так и примембранных частей p75NTR оставалась неизученной. Таким образом, исследование взаимосвязи между состояниями ТМД и "чоппера" p75NTR может прояснить структурные основы механизмов активации рецептора.

Пространственная структура димера ТМД p75NTR, как дикого типа, так и неактивного мутанта C257A была получена в 2016 г. [522]. Поэтому, в рамках сформулированного выше

подхода было решено изучить поведение связки ТМД с "чоппером" p75 в различных состояниях и различном мембраноподобном окружении. Для исследования был выбран фрагмент рецептора длиной 64 остатка, включающий в себя позиции 245-308 p75NTR крысы *Rattus Norvegicus*, нумерация указывается в соответствии с базой данной UNIPROT, запись № P07174. Выбор белка крысы, а не человека обусловлен сотрудничеством с лабораторией испанского учёного M.Vilar, в которой имелись различные генетические конструкции на основе p75NTR крысы, для которых может проводиться тестирование биологической активности. Данный белок, p75-TM-чоппер был ресолюбилизирован в трёх типах мембраноподобных сред - мицеллах DPC, бицеллах DMPC/DHPC q=0.3 и ЛБН DMPC/DMPG/MSP1D1 4:1. Для создания максимально нативного окружения, исследования методом ЯМР проводили при pH 6.5-6.8 в присутствии 50 мМ NaCl. Во всех мембраноподобных средах для белка удалось получить спектры высокого разрешения, в которых было проведено отнесение сигналов. Кросс-пики от остатков ТМД наблюдались только в мицеллах и бицеллах, в то время как в ЛБН данная часть белка никак не проявлялась в связи с низкой подвижностью частиц нанодисков. Поскольку сложно предложить критерии, по которым можно судить о нативности структуры белка, *a priori* считалось, что наиболее адекватное окружение получается в ЛБН, но структура и динамика домена "чоппер" была охарактеризована как в мицеллах/бицеллах, так и в нанодисках.

Для изучения поведения белка использовались два параметра - индекс вторичного химического сдвига (CSI), как индикатор вторичной структуры и общей упорядоченности региона белка, а также скорость кросс-скорелированной релаксации амидных групп (η_{xy}), как индикатор движений участка молекулы в пс-нс диапазоне. Согласно данным химических сдвигов ЯМР, спираль ТМД образуется на участке L253-W276, в то время как домен "чоппер" (N277-I308) неупорядочен (Рис. 94). Удивительно, что если положение кросс-пиков от ТМД существенно разнилось в мицеллах и бицеллах, химические сдвиги сигналов от остатков домена "чоппер" оставались неизменными. На основании этого можно предположить, что "чоппер" никак не взаимодействует с мембраной. Гипотеза подтверждается данными ЯМР-релаксации: значения η_{xy} не отличались от нуля в рамках погрешности для большинства остатков домена "чоппер", за исключением остатков N277-K283 в ЛБН, которые находятся в непосредственной близости к поверхности мембраны частицы. Следовательно, "чоппер" не только неупорядочен, но и чрезвычайно подвижен в пс-нс диапазоне скоростей процессов. Более того, следует отметить, что исследования в мицеллах проводили как при LPR 35, когда большая часть ТМД образует димеры посредством межмолекулярной дисульфидной связи C257, так и при LPR 140, когда основная доля белка находится в мономерной форме. При этом,

никакого влияния LPR на спектр домена "чоппер" не выявляется. Разведение детергентом не влияло на химические сдвиги сигналов от домена "чоппер", в то время как сигналы ТМД двоились и наблюдался переход димер-мономер. Следовательно, "чоппер" неупорядочен независимо от олигомерного состояния ТМД, более того димеризация ТМД никак не влияет на ансамбль конформаций домена. Таким образом, было показано, что домен "чоппер" (а) неупорядочен, (б) крайне подвижен и его движения никак не сопряжены с состоянием ТМД и (с) не взаимодействует с мембраноподобным окружением. Перечисленные наблюдения ставят под сомнение принятую ранее гипотезу о механизме активации p75NTR. Сам механизм, и его соответствие экспериментальным данным будет обсуждаться в деталях в разделе 7.3.

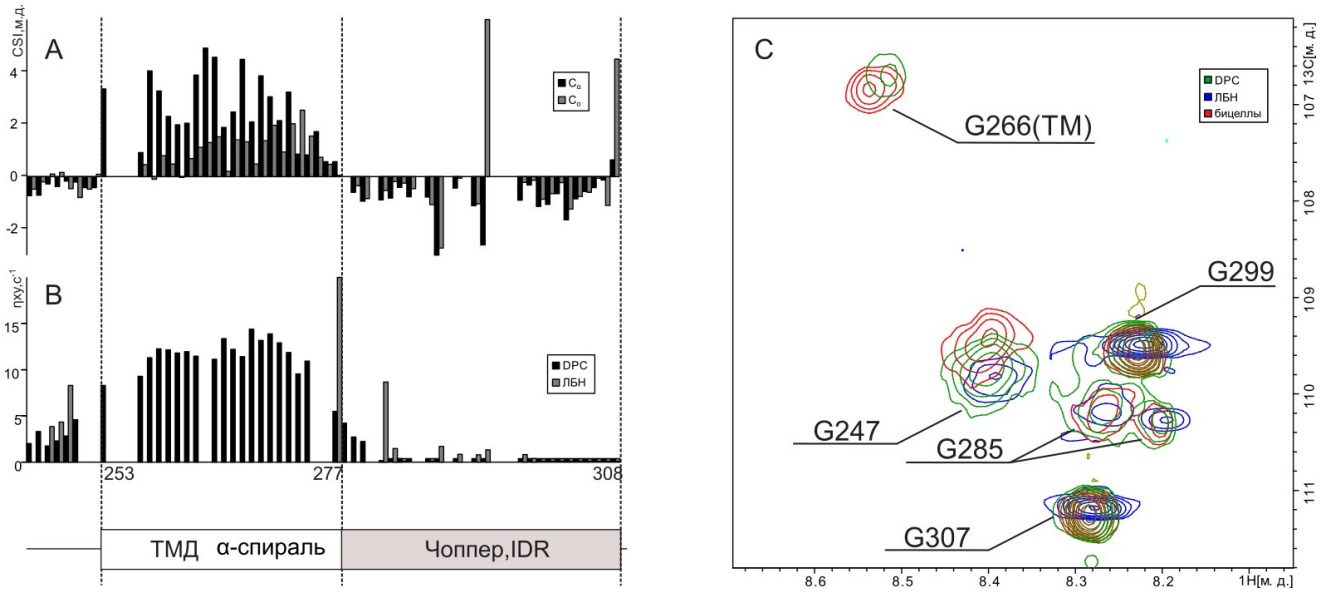

Рисунок 94. A - индекс вторичного химического сдвига ядер ^{13}Cα и ^{13}Co белка p75-TM-чоппер в мицеллах DPC. **B -** скорость кросс-скорелированной релаксации амидных групп p75-TM-чоппер в мицеллах DPC (черные прямоугольники) и в ЛБН (серые прямоугольники). **C** - суперпозиция фрагментов трех спектров ^{1}H,^{15}N-HSQC p75-TM-чоппер в мицеллах DPC (показан зеленым), ЛБН (синим) и бицеллах (красным). Фрагменты содержат сигналы от остатков Gly, отнесение сигналов приведено.

Резюмируя раздел 7.2 можно заключить, что добавление даже таких небольших частей, как примембранные регионы, к ТМД белков позволяют получить важную дополнительную информацию о поведении МБ с одним ТМ сегментом. В присутствии ТМД можно изучать структуру примембранных регионов в более нативном контексте, в то время как наличие примембранных регионов также может оказывать влияние на конформацию ТМД, что позволяет получить более адекватную модель исследуемых доменов белка.

7.3. Конструкции, содержащие ТМ домены и внутриклеточные домены

7.3.1. Исследование конструкции p75-ΔECD

Успешные примеры исследования связок ТМД с примембранными регионами позволили предположить, что схожую работу можно провести и с более крупными фрагментами, содержащими как ТМ, так и полноразмерный внутриклеточный домен МБ. Выбор в пользу внутриклеточных частей обусловлен особенностями гетерологической продукции и рефолдинга конструкций. Внеклеточные домены большинства белков содержат цистеиновые мостики, которых чаще всего достаточно много, что практически исключает получение нативно свёрнутых фрагментов МБ с внеклеточными доменами в системах продукции на основе бактерий. Цитоплазматические домены (ЦПД), напротив, если и содержат цистеины, то они оказываются незамкнутыми, в силу окислительно-восстановительного потенциала цитозоли клеток эукариот [524]. Поэтому, ЦПД многих белков, в частности TLR, p75NTR, FGFR были успешно получены в бактериях [527–529]. Для целей настоящей работы было принято решение изучить конструкцию, содержащую ТМД и ЦПД рецептора p75NTR. Во-первых, после исследования белка p75-ТМ-чоппер появилось много вопросов о том, каким образом происходит переключение состояний ЦПД p75NTR после лиганд-индуцируемой активации белка. Во-вторых, ЦПД p75NTR имеет наименьший размер (всего 150 а.о.) среди всех известных клеточных рецепторов/МБ-1. Для сравнения, размер киназного домена РТК в среднем составляет 350 а.о., а размер TIR доменов TLR - 200 а.о. Таким образом, в качестве объекта исследования был избран фрагмент p75NTR крысы массой 21 кДа, включающий остатки 245-425 рецептора с N-концевой полигистидиновой последовательностью и специфическим сайтом щепления протеазы тромбин (далее - p75-ΔECD). ЦПД p75 включает в себя три условных домена - "чоппер" на N-конце, глобулярный "домен смерти" на C-конце [394] и линкерный участок между ними, который предположительно неструктурирован.

Поскольку p75-ΔECD является многодоменным белком, который может денатурировать в присутствии детергентов, был проведён скрининг мембраноподобных сред, результаты которого представлены в разделе 4.9.4. данной работы и на рисунке 36. Было показано, что внутриклеточный домен сохраняет свою структуру только в ЛБН и бицеллах с детергентами CHAPS или Façade-EM. При этом, в спектрах ЯМР наблюдались сигналы исключительно от внемембранных доменов белка, даже при полном дейтерировании, поэтому было проведено

дополнительное исследование влияния липидного состава ЛБН на вид спектра p75-ΔECD. Объект был встроен в нанодиски из ненасыщенных липидов (POPC), анионных липидов (DMPG), а также в ЛБН, собранные из укороченных вариантов MSP1D1 [42]. С помощью укороченных белков можно получить нанодиски меньшего размера, что в теории должно позволить получить спектры ЯМР ТМ домена p75NTR. Были опробованы три белка: MSP1D1 (масса нанодиска 124 кДа), MSP1D1ΔH5 (95 кДа) и MSP1D1ΔH4-6 (52 кДа). ЛБН собирались при избытке липида, чтобы получить соотношение 1 белок на 1 частицу. Ни один из протестированных типов ЛБН не позволил наблюдать сигналы от ТМД p75-ΔECD, но, что удивительно, обнаружилась обратная корреляция между размером частиц и качеством спектров ЯМР цитоплазматического домена p75 - наилучшее качество спектров домена смерти наблюдалось в самых больших частицах, в то время как интенсивность и полуширина сигналов от участков домена "чоппер" и линкерного участка оставались неизменными (Рис. 95). ЛБН, приготовленные из POPC и DMPG также оказались хуже, чем ЛБН из DMPC с точки зрения качества спектров домена смерти белка.

Чтобы разобраться в причинах подобного поведения была измерена самодиффузия ЛБН приготовленных образцов. Поскольку одной из стадий сборки ЛБН была метал-хелатная афинная хроматография, все частицы ЛБН содержали как минимум одну молекулу белка, "пустых" частиц в растворе не было. Поскольку не наблюдалось пропорции между размером ЛБН и гидродинамическим радиусом частиц, можно заключить, что диффузия частиц зависит в первую очередь от компактности ЦПД p75NTR (рис. 95B). Компактность максимальна в случае ЛБН MSP1/DMPG (4 нм), и минимальна для MSP1D1ΔH4-6 (5.5 нм). Можно увидеть, что ЦПД более компактен в больших ЛБН, что говорит о возможности короткоживущих взаимодействий домена с поверхностью липидного бислоя, в первую очередь с анионными головными группами. В то же время, по данным вращательной диффузии (Рис. 95C), подвижность домена смерти увеличивается с размером ЛБН. Это возможно, если глобулярная часть ЦПД может взаимодействовать с белком MSP. При увеличении размера ЛБН вероятность такого взаимодействия уменьшается, что приводит к ускорению движений домена.

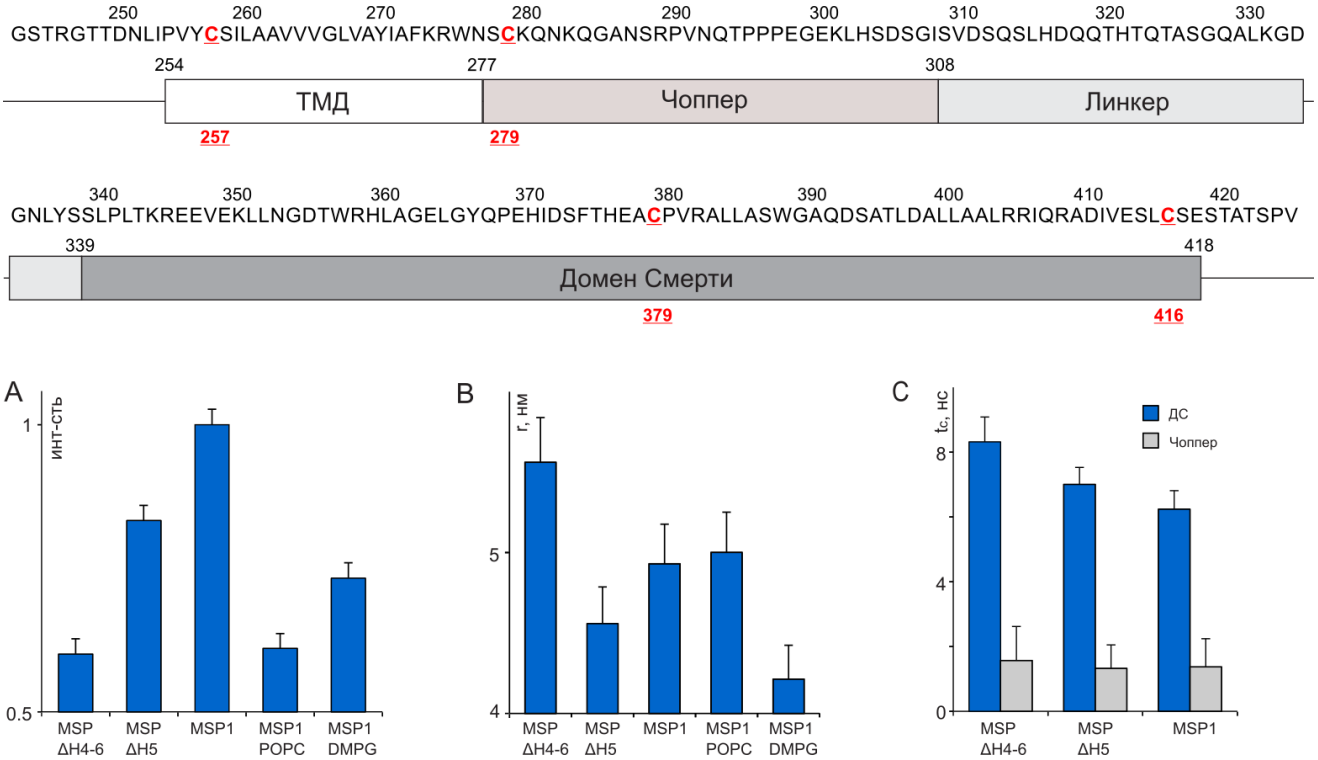

Рисунок 95. Сверху - аминокислотная последовательность p75-ΔECD с указанием положения доменов p75NTR. **A** - относительная интенсивность (на единицу концентрации) сигналов домена смерти p75 в p75-ΔECD в составе нанодисков различных типов. **B** - гидродинамические радиусы ЛБН с p75-ΔECD. **C** - среднее время корреляции вращательной диффузии домена смерти p75-ΔECD (синим) и чоппер-домена белка (серым) в нанодисках, собранных из различных вариантов белка MSP1.

Чтобы получить полную информацию о подвижности и структуре p75-ΔECD, ^{15}N и ^{15}N/^{13}C-меченые варианты белка были встроены в ЛБН MSP1D1/DMPC/DMPG 4:1 в восстановительных условиях (5 mM DTT) при LPR 150 (1 белок на 1 частицу), проведено отнесение сигналов в спектрах ЯМР. Кросс-пики в спектрах HSQC могут быть легко подразделены на два множества - сигналы от остатков домена смерти и сигналы от "чоппер" и линкерного доменов. Сигналы от домена смерти (ДС) абсолютно совпадают со спектром изолированного ДС в фосфатном буфере [530], следовательно наличие липидной мембраны ЛБН никак не влияет на структуру этой части p75NTR. Более того, химические сдвиги практически идентичны опубликованным ранее Liepnisch с соавторами для изолированного ДС [527], следовательно структура домена идентична PDB ID 1NGR, что подтверждается предсказанием вторичной структуры в программе TALOS-N [343] (Рис. 96). С другой стороны, весь линкерный регион, наблюдаемый в ЛБН при помощи ЯМР, в том числе и "чоппер", неупорядочен. Сигналы остатков "чоппера" 284-303 расположены в тех же самых позициях, что и в спектрах изученной ранее конструкции p75-TM-чоппер. То есть конформационное

пространство неструктурированного домена никак не изменяется из-за присутствия в составе слитной конструкции "домена смерти" p75NTR. Сигналы остатков 304-308 смещены по сравнению с укороченной конструкцией, вероятнее всего из-за заряда С-концевого остатка I308.

Для анализа движений p75-ΔECD, для большинства остатков белка были измерены параметры релаксации ядер ^{15}N. Удалось получить 4 набора параметров: времена продольной и поперечной релаксации (T_1 и T_2), равновесный гетероядерный ЯЭО ^{1}H-^{15}N (NOE) и скорость кросс-скорелированной релаксации ^{1}H-^{15}N (η_{xy}), гистограммы показаны на рисунке 96. Перечисленные величины по-разному зависят от наличия движений в пс, нс и мкс-мс диапазонах, что позволяет проводить простую интерпретацию результатов. Параметры релаксации выявляют чрезвычайно высокую подвижность линкерного участка (отрицательный NOE, T_2~0.4 с и η_{xy}~2c^{-1}). Домен смерти белка относительно стабилен с точки зрения пс движений (NOE=0.9), но его подвижность в нс диапазоне слишком велика, время корреляции вращательной диффузии составляет 6±1 нс. Отметим, что программа HYDRONMR [531] предсказывает время вращательной корреляции 5.8 нс для структуры 1NGR [527], которая соответствует изолированному домену смерти. Иными словами, движения глобулярного домена смерти рецептора p75 в мономерной форме никак не сопряжены с движениями ТМ α-спирали, линкерный участок и чоппер неупорядоченны и подвержены движениям в пс-нс диапазоне, ни один из доменов белка не выявляет способности взаимодействовать с липидными мембранами, наблюдаются только короткоживущие контакты, совершенно не влияющие на структуру объектов исследования.

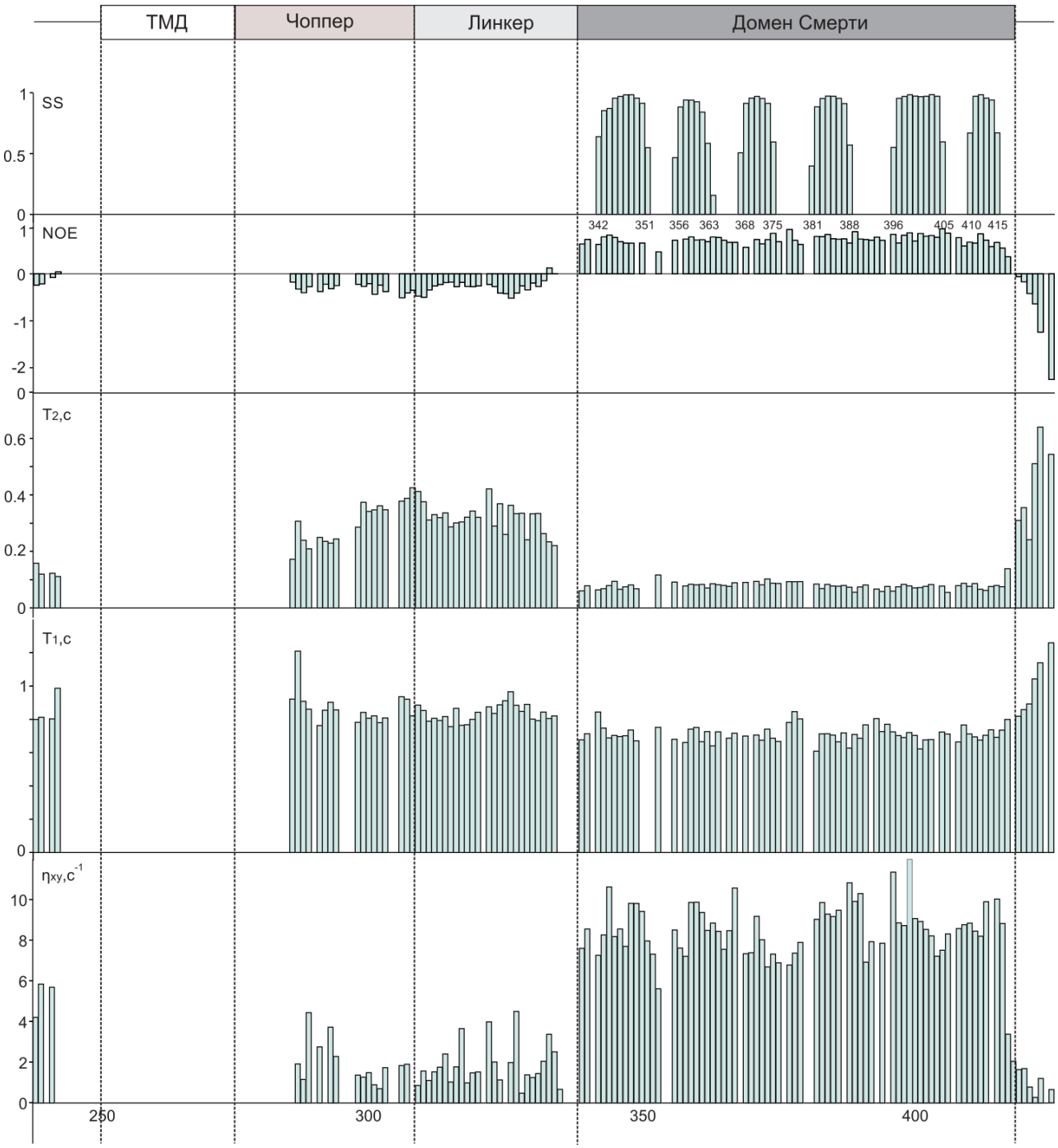

Рисунок 96. Структура и динамика p75-ΔECD в ЛБН DMPC/DMPG/MSP1D1. **SS** -вторичная структура, предсказанная на основании химических сдвигов в программе TALOS. +1 соответсвует α-спирали, -1 - β-структуре.

Для изучения взаимодействия между доменами смерти p75, которое должно происходить с точки зрения механизма активации "snail tong", были приготовлены образцы, где несколько копий белка p75-ΔECD приходилось на одну частицу мембраноподобной среды. В результате,

были получены 4 препарата белка с соотношением p75-ΔECD/ЛБН 1:1, 3:2, 2:1 и 6:1. Ковалентный димер с замыканием дисульфидной связи C257 собрать не удалось, из-за высокой реакционной способности других остатков цистеина ЦПД p75NTR, которые начинают образовывать межмолекулярные ковалентные связи сразу после отмывки от восстанавливающего агента. Это, в свою очередь, приводит к олигомеризации высокого порядка и образованию ненативных комплексов. Поэтому, все эксперименты проводились в сильно восстанавливающих условиях (5мМ DTT), а ковалентная димеризация имитировалась за счёт насыщения частиц ЛБН белком. Начальное исследование образцов позволило выявить следующую закономерность: интенсивность сигналов от домена смерти, компактность ЦПД p75, а также подвижность домена смерти уменьшались с увеличением содержания белка в частицах ЛБН (Рис. 97).

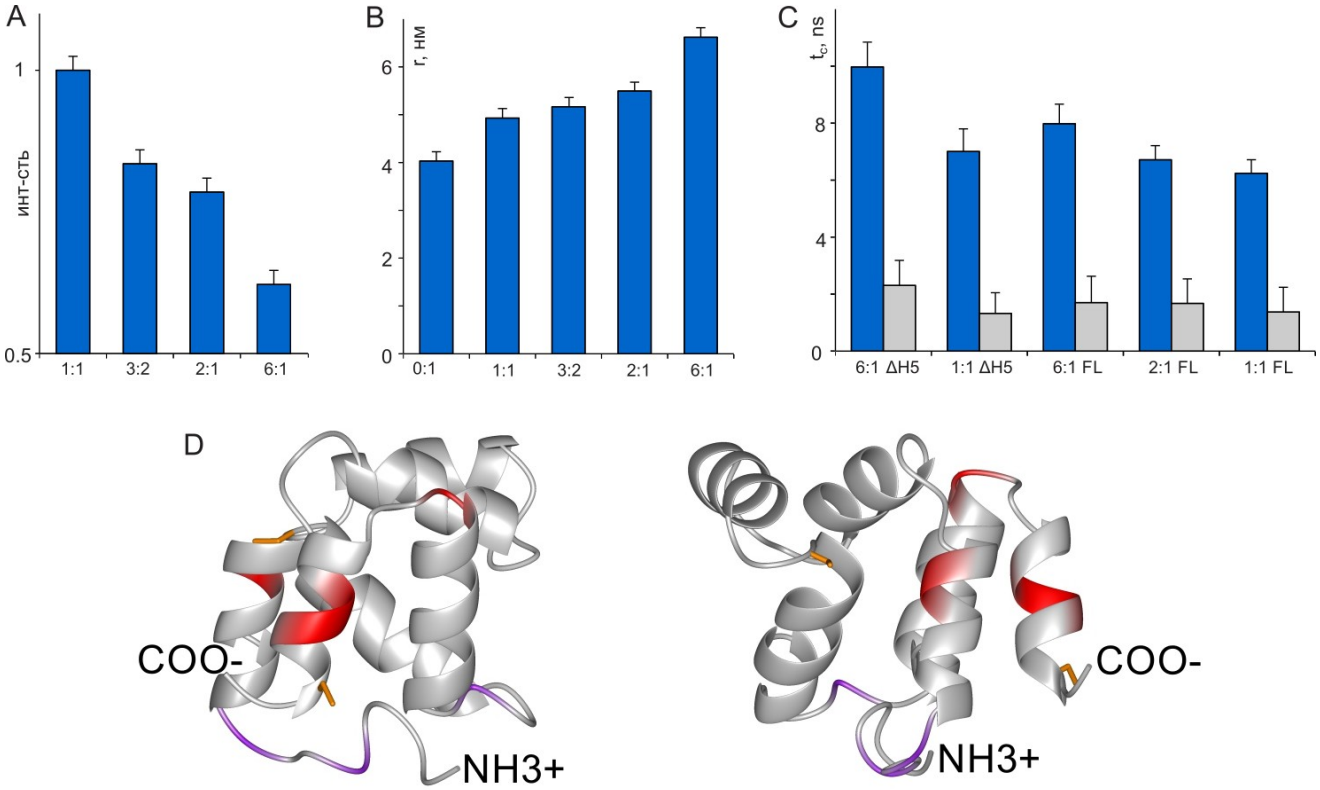

Рисунок 97. A - относительная интенсивность сигналов от домена смерти p75-ΔECD при различных соотношениях белок/ЛБН. **B -** гидродинамический радиус частиц ЛБН/p75-ΔEC при различных соотношениях белок/ЛБН. **C** - среднее время корреляции вращательной диффузии, измеренное для остатков домена смерти (синим) и "линкер" (серым) p75-ΔECD при различных соотношения белок/ЛБН, в ЛБН из полноразмерного MSP1D1 (FL) и из MSP1D1ΔH5. **D** - на пространственной структуре домена смерти p75NTR (PDB 1NGR) красным и фиолетовым цветом обозначены остатки, для которых наблюдается усиление попереченой релаксации в зависимости от соотношения белок/ЛБН.

С другой стороны, изменения химических сдвигов сигналов в спектрах не наблюдалось, следовательно структура домена смерти и конформационное пространство доменов "чоппер" и "линкер" остаются неизменными для всех изученных заселенностей нанодисков. Более того, вращательная диффузия домена смерти изменяется незначительно, в ЛБН 6:1 τ_C всего на 1.5 нс увеличено по сравнению с частицами 1:1. При этом, можно ожидать увеличения на 11 нс при образовании стабильного димера, согласно предсказанию в программе HYDRONMR [531]. Конечно, можно предположить, что образуется стабильное димерное состояние, которое характеризуется настолько медленной вращательной диффузией, что сигналы от белка в этой форме не наблюдаются в спектрах ЯМР. Однако, согласно полученным данным, в то время как нормированная интенсивность на единицу концентрации белка действительно уменьшается для остатков домена смерти при увеличении заселенности частиц ЛБН, интенсивность от сигналов доменов "чоппер" и "линкер" не изменяется. Поэтому, даже если "невидимая" димерная форма и существует, она не сопряжена со стабилизацией неструктурированных примембранных доменов белка. К тому же, потеря интенсивности сигналов домена смерти происходит постепенно и может быть объяснена изменением поперечной релаксации ядер домена из-за замедления подвижности, что согласуется со всеми остальными данными ЯМР о поведении белка. Отметим, что в ЛБН с содержанием белка 6:1 как минимум три копии белка будут одинаково ориентированы в бислое. С учётом ограниченности движения домена смерти в нанодиске радиусом 5нм можно оценить, что эффективная концентрация домена смерти составит более 1мМ, что чрезвычайно много и обычно более чем достаточно для возникновения любых специфических взаимодействий. Таким образом, полученные данные однозначно показывают, что со-локализация нескольких копий p75-ΔECD в одном ЛБН не приводит к стабильной и специфической ассоциации доменов смерти рецептора, возникают только короткоживущие неспецифические контакты.

Для детального изучения взаимодействий между ЦПД p75NTR для образца с содержанием белка на ЛБН 6:1 были измерены параметры ЯМР-релаксации ядер ^{15}N p75-ΔECD (Рис.98). Были обнаружены однородные изменения продольной релаксации домена смерти, связанные с замедлением его движений, в то время как параметры продольной релаксации неупорядоченных доменов белка остались неизменными. В то же время, изменения времён поперечной релаксации амидных групп оказались не настолько однородными. Для семи остатков наблюдается значительное усиление поперечной релаксации в "заселённом" образце. Данные остатки принимают участие в медленных движениях домена смерти в мкс-мс диапазоне, которые зависят от количества белка в нанодисках, то есть, скорее всего в

образовании короткоживущей и слабо населённой димерной формы. Эти остатки можно разделить на две поверхности: S339, L342 и A394 образуют сайт ближе к N-концу домена (обозначен фиолетовым на Рис. 97), а E412, V413, I406 и E349 образуют сайт на C-конце белка. Взаимодействия по этим поверхностям достаточно слабы - они не приводят к изменениям химических сдвигов (то есть не влияют на структуру белка) и не приводят к существенному понижению подвижности доменов.

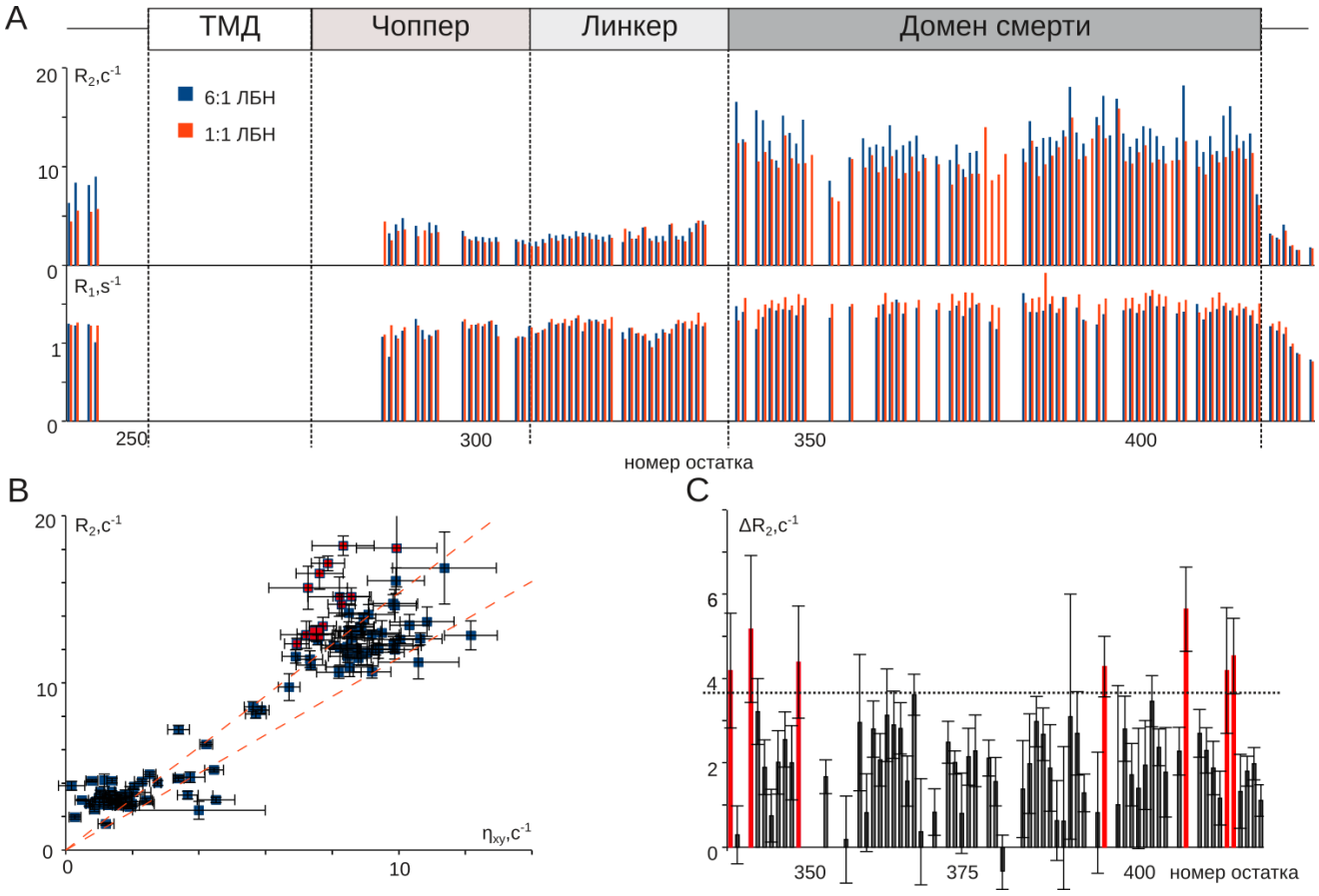

Рисунок 98. A - Скорости продольной и поперечной релаксации ^{15}N p75-ΔECD нанодисках с соотношением ЛБН/белок 1:1 и 6:1. **B** - график R_2 (η_{xy}). Пунктирными линиями выделена область, точки за пределами которой соответствуют областям с медленными движениями [532]. **C** - изменения скорости поперечной релаксации ^{15}N, измеренной в образцах с соотношением белок/ЛБН 1:1 и 6:1.

7.3.2. Полученные данные в контексте механизма активации p75NTR.

Чтобы оценить перспективы изучения крупных фрагментов рецептора необходимо рассмотреть полученный данные в контексте механизма активации p75NTR. Для этого следует в первую очередь суммировать полученные данные:

1. Домены смерти p75 не димеризуются, даже если несколько копий p75-ΔECD оказываются внутри одного ЛБН.

2. Движения домена смерти никак не связаны с движениями ТМД в нанодисках.

3. Структуры линкер-чоппер домена и домена смерти никак не зависят от наличия в белке других доменов, присутствия мембраны и т.п.

4. Домены "чоппер" и "линкер" неупорядоченны во всех вариантах окружения, опробованных в настоящей работе.

5. Ни один из доменов p75 не проявляет склонности взаимодействовать с мембраной, за исключением чрезвычайно короткоживущих контактов ЦПД белка с поверхностью ЛБН DMPG.

В целом, перечисленные наблюдения позволяют глубже понять механизм активации p75.

Если рассматривать механизм "snail tong", то его основными требованиями является димеризация доменов смерти и передача информации о связывании лиганда внутрь клетки, через изменение структуры ковалентного димера ТМД. То есть, конформация домена смерти должна быть чувствительная к структуре димера ТМД. Таким образом, все данные полученные в представленной работе противоречат этому механизму. Во-первых домены смерти не димеризуются, даже в присутствии ТМД и фрагмента липидной мембраны. Во-вторых, конформация ЦПД никак не сопряжена с состоянием трансмембранной части белка, поскольку примембранный регион рецептора представляет собой высокоподвижный неструктурированный участок. При этом, условия, использованные в работе сравнительно "физиологические" - 70 мМ NaCl, pH 6.8, 30 ºC. Иными словами, необходимо предложить другие гипотезы о механизме активации рецептора нейротрофинов p75NTR. В качестве наиболее простой версии можно рассмотреть механизм лиганд-индуцируемой димеризации (ЛИД, Рис.99). В соответствии с этой моделью, в неактивном состоянии белок находится в форме мономера и димеризуется только после связывания с лигандом. В свою очередь, димеризация является ключевым событием для запуска внутриклеточного каскада. Однако, для клеток PC12, которые не производят NGF, было показано присутствие значимых количеств ковалентного димера p75 [401], то есть механизм ЛИД противоречит данным исследований на клетках.

Поэтому, необходимо предложить процесс, в котором активное и неактивное состояние p75NTR являются ковалентным димером, а взаимосвязь между структурой ТМД и ЦПД не осуществляется через гибкие неупорядоченные линкерные участки, и домены смерти не образуют жёсткий димерный комплекс. Например, связывание лиганда может привести к

миграции рецептора в специализированную область клеточной мембраны, в липидный рафт, из-за изменения угла скрещивания ТМ α-спиралей в димере. В таких микродоменах рецептор может активироваться за счёт кластеризации, как и другие рецепторы семейства TNFR (Рис. 99 C) [111]. С другой стороны, связывание с лигандом может вызывать конформационную перестройку ТМД, что, в свою очередь, приводит к процессингу рецептора различными протеазами, например, α- и γ-секретазами [533] (Рис. 99D). При том образуются фрагменты белка, что и является "спусковым крючком" для внутриклеточного каскада. Оба механизма никак не противоречат структурным данным, поскольку не требуется связь между конформациями ЦПД и ТМД, достаточно изменения структуры ТМД, чтобы произошло ключевое событие. Два предложенных сценария необходимо проверить на клетках в будущем.

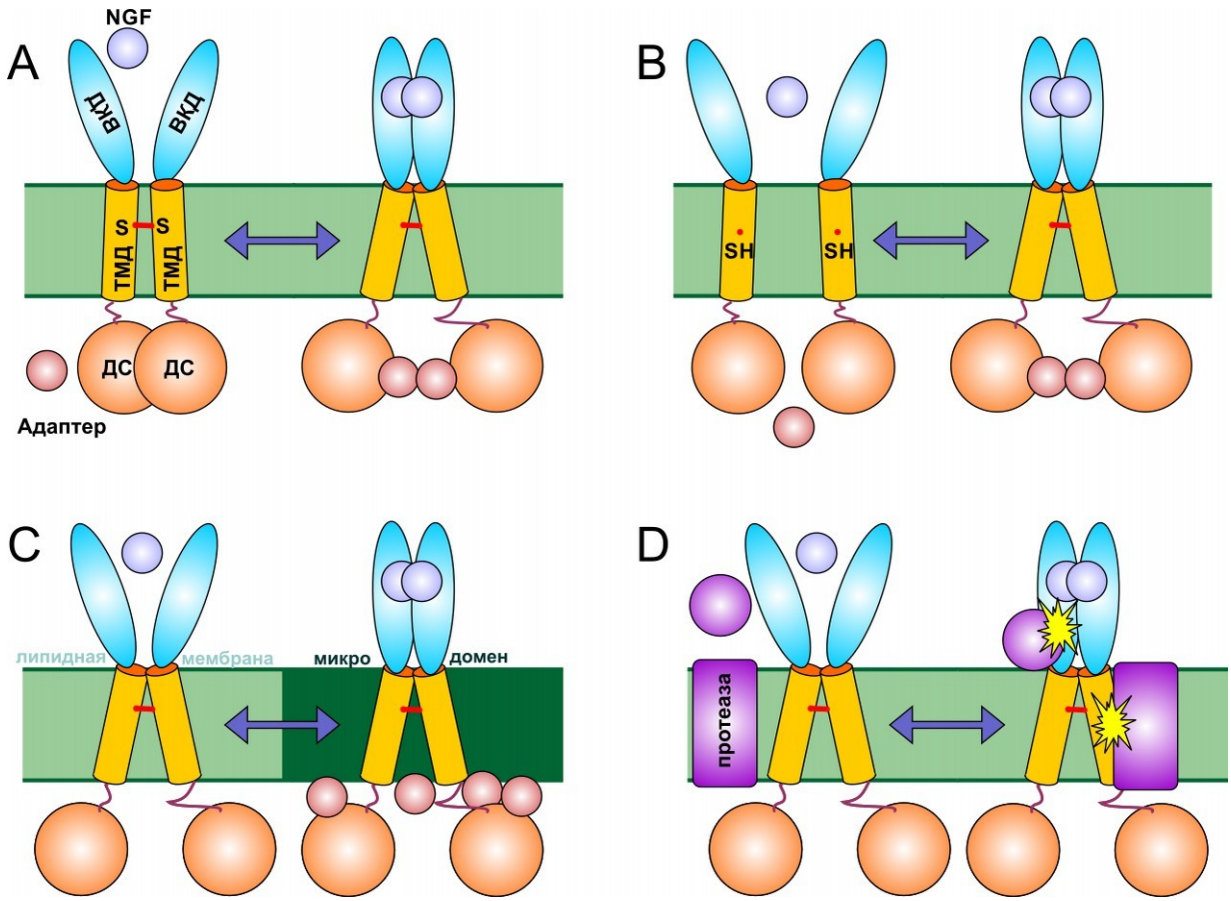

Рисунок 99. Возможные механизмы активации рецептора нейротрофинов p75NTR. **A** - snail tong. ВКД - внеклеточный домен, ДС - домен смерти, NGF - фактор роста нейронов. **B** - лиганд-индуцируемая димеризация. **C** - лиганд-индуцируемая миграция в микродомены клеточной мембраны. **D** - лиганд-индуцируемый протеолиз.

7.4. Полноразмерные белки - структура NRADD.

Логичным следующим шагом после изучения связки двух доменов является исследование полноразмерного трехдоменного белка с одним ТМ сегментом. Основным ограничением на выбор объекта является отсутствие дисульфидных связей во внеклеточном домене, что позволяет надеяться на возможность ресолюбилизации такого МБ в частицах мембраноподобных сред. Поиск подходящего белка среди всех потенциальных объектов лаборатории выявил всего один вариант - гомолог рецептора p75NTR, NRADD или p45. NRADD влияет на нейротрофиновую сигнализацию через тропомиозиновую киназу TrkA, а также ко-экспрессируется с рецепторами p75 и сортилином, регулируя нейротрофин-индуцируемый апоптоз [534,535]. Основной целью исследования NRADD можно рассматривать проверку принципиальной возможности изучения полноразмерных МБ с одним ТМ сегментом при помощи спектроскопии ЯМР, а также выяснение его структурной организации. NRADD - достаточно крупный белок размером 228 а.о., из которых 52 составляют внеклеточный домен, функция которого не до конца выяснена. При этом внутриклеточная часть белка высоко гомологична таковой у p75NTR и содержит домен смерти и линкерный участок неизвестной структуры.

В качестве мембраноподобной среды для NRADD наилучшим образом показали себя бицеллы DMPC/CHAPS q=1.0-1.2. В этом окружении в спектрах ЯМР можно было наблюдать большое количество кросс-пиков с хорошей дисперсией, сам спектр во многом был похож на опубликованный ранее спектр изолированного домена смерти белка [530]. Соотношение липид/белок составило 200:1, то есть работа велась при значительном избытке бицелл по отношению к NRADD. Высокое качество спектров позволило получить отнесение сигналов 78% ядер основной цепи белка. В спектрах не удалось обнаружить сигналов от 8 N-концевых остатков и от 40 остатков, которые образуют ТМ домен с прилегающими примембранными регионами. Предположительно, на N-конце белка сигналы уширяются из-за ускоренного обмена амидных протонов с растворителем, а сигналы ТМД не видны в силу быстрой поперечной релаксации из-за большого размера бицеллы и ее ограниченной подвижности. Для найденных спиновых систем было проведено отнесение сигналов боковых цепей и зарегистрированы спектры NOESY, что позволило определить пространственную структуру белка (Рис. 100). N-концевой домен имеет длину 52 остатка и неструктурирован. Цитоплазматический домен состоит из двух частей - неупорядоченного примембранного участка и глобулярного домена смерти с характерной шестиспиральной укладкой. Неупорядоченность N- и C-концевых примембранных регионов подтверждается отсутствием контактов ЯЭО дальнего диапазона, а также анализом

химических сдвигов в программе TALOS-N (Рис. 101B). Структура домена смерти отдельно и в контексте полноразмерного белка во многом схожи, СКО атомов основной цепи составляет 3.0 А. Отличия, вероятнее всего, связаны с разницей в методах определения структуры, программном обеспечении, количестве ограничений, но не вызваны присутствием бицеллы и примембранных регионов. В целом, структура NRADD соответствует данным об организации рецептора p75NTR, полученным ранее, и напоминает рецептор без массивного эктодомена. В то время как можно было ожидать неструктурированность линкерного участка между ТМД и доменом смерти, неупорядоченность эктодомена - свойство белка, которое ранее никогда экспериментально не подтверждалось.

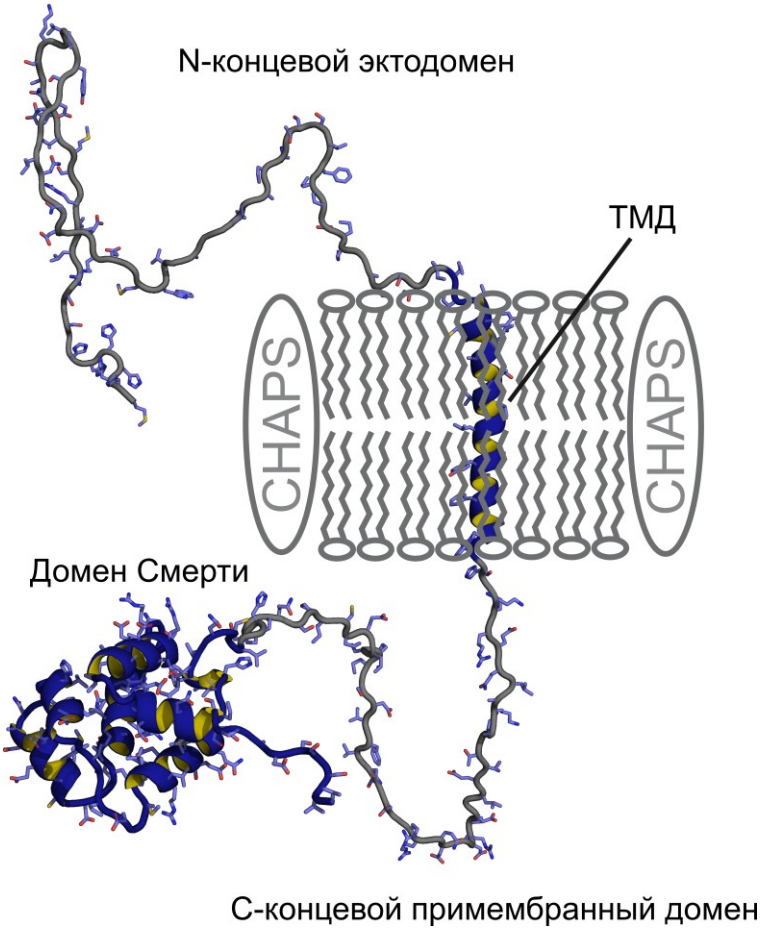

Рисунок 100. Пространственная структура NRADD со схематичным изображением бицеллы DMPC/CHAPS.

Чтобы дополнительно изучить неупорядоченные участки белка, были измерены данные ЯМР-релаксации ^{15}N, а именно - параметр η_{xy} (Рис. 101 C). Аналогично p75NTR, время

корреляции вращательной диффузии домена смерти в составе NRADD (6.8±1.5 нс) лишь слегка ниже, чем предсказано для изолированного домена (5.8 нс), что говорит об отсутствии взаимосвязи между состоянием ТМД и ЦПД. Таким образом, примембранные регионы не накладывают ограничения на движения глобулярного водорастворимого домена, а также, судя по всему, не взаимодействуют с поверхностью бицелл DMPC/CHAPS за исключением 5-6 наиболее близких к мембране остатков, сигналы которых не наблюдаются в спектрах ЯМР. Дополнительно, подвижность доменов позволяет заключить, что домены смерти NRADD не димеризуются/олигомеризуются.

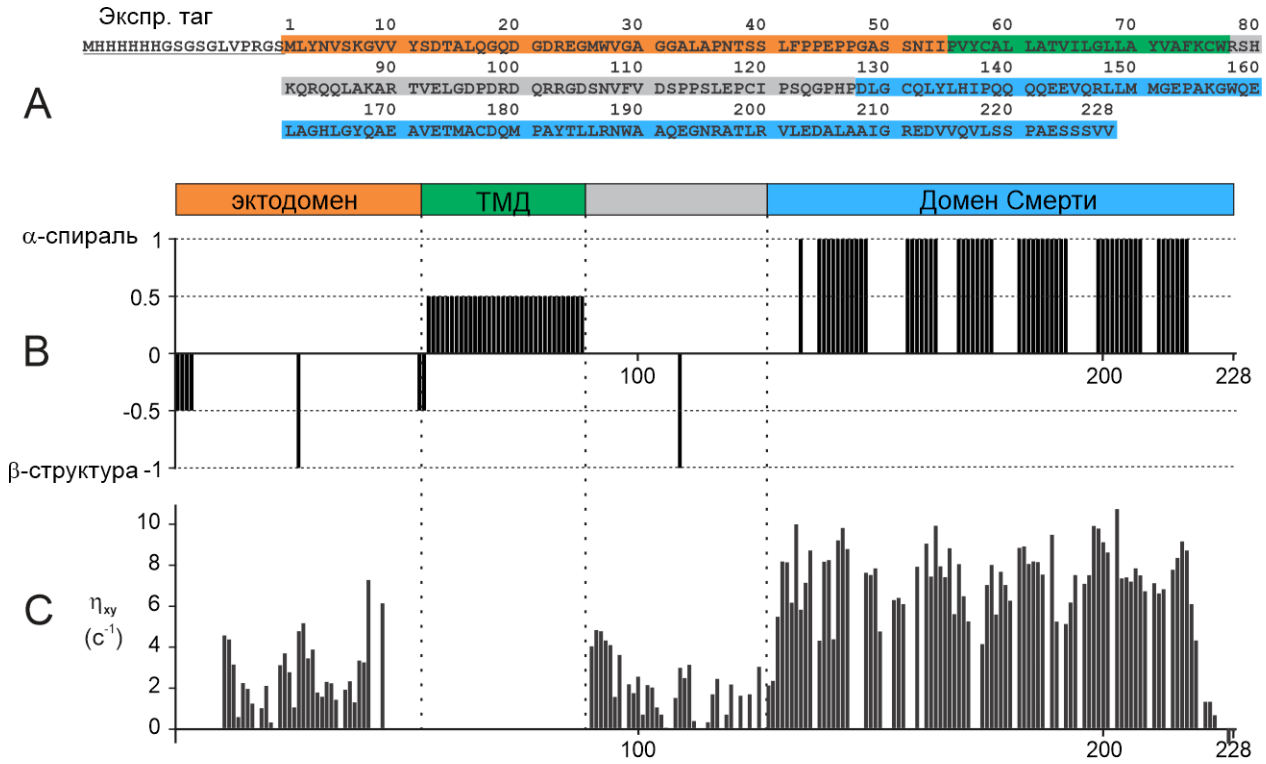

Рисунок 101. A - аминокислотная последовательность NRADD, домены обозначены цветом, оранжевым - эктодомен, зеленым - ТМД, серым - линкерный участок, синим - домен смерти. **B** - предсказание вторичной структуры NRADD на основании химических сдвигов ядер белка по данным программы TALOS-N. **C** - скорость кросс-скорелированной релаксации амидных групп η_{xy} остатков NRADD.

В заключение отметим, что на примере NRADD было проведено первое в мире исследование структуры МБ с одним ТМ сегментом, содержащего внеклеточный и внутриклеточный домены значительного размера. Несмотря на то, что структура NRADD, в отличие от структуры p75-ΔECD, не представляет большого интереса для объяснения механизмов функционирования белка, проведённая работа показывает потенциальную

применимость и перспективы ЯМР-спектроскопии высокого разрешения в области исследования структуры более крупных полноразмерных МБ схожего типа.

7.5. Заключение

Резюмируя главу 7, можно отметить, что исследование крупных фрагментов МБ вместо отдельных доменов позволяет решить две важнейших задачи. В первую очередь - получить более достоверную информацию о структуре доменов МБ. Например, если бы велось исследование исключительно домена "чоппер" p75 и он оказался бы неупорядочен, этот результат вызвал бы массу сомнений. Ведь домен мог бы структурироваться при взаимодействии с мембраной, трансмембранным доменом или доменом смерти. В случае же p75-ΔECD или NRADD никаких сомнений не возникает - ведь в конструкции присутствовали все три домена и фрагмент липидной мембраны с варьируемым составом. Точно так же, структура димера HER2 с примембранными регионами, скорее всего, ближе к нативной конформации, чем структура димера ТМД в мицеллах. Наконец, совершенно непонятно, что дало бы исследование HR-региона TLR4 в отдельности, в то время как многое стало понятно об архитектуре толл-подобных рецепторов, благодаря исследованию конструкции, содержащий предполагаемые регионы ТМД и HR (см. раздел 5.3.2). Во-вторых, можно получить информацию, которую невозможно узнать другими способами - данные о взаимосвязи между состояниями доменов. Так, в результате исследования динамики конструкции p75-ΔECD удалось продемонстрировать ошибочность предлагаемого ранее механизма активации рецептора p75NTR и предложить новые гипотезы, удовлетворяющие всем структурным данным.

8. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исчерпывающее описание всех использованных методик можно найти в научных статьях, опубликованных автором по теме диссертации, поэтому ниже приводится краткое описание основных экспериментальных подходов.

8.1. Материалы

8.1.1. Растворители

Все дейтерированные растворители - трифторэтанол-d_2 (ТФЭ), метанол-d_3, хлороформ-d, гексафторизопропанол-d_2 (ГФИП), D_2O были приобретены в компании Campridge Isotope Laboratories, США.

8.1.2. Липиды

В настоящей работе использовались липиды и детергенты - лаурилсаркозинат натрия (LS), холиевая кислота, CHAPS, CHAPSO, Facade-EM, Facade-EPC, DHPC, DH_7PC, SDS, DPC (FOS-12), FOS-16, DLPC, DMPC, DMPG, DMPE, DMPS, DPPC, POPC, смесь сфингомиелинов яичного желтка. Все липиды приобретались в компании Avanti Polar Lipids Inc., США.

Дейтерированные производные липидов, DMPC-d_{54} и DHPC-d_{22} были синтезированы Чупиным В.В. в лаборатории Биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН.

8.1.3. Белки

GpAtm: остатки 89-117 человеческого гликофорина А (UNIPROT: P02724), синтезирован в культуре бактерий *E. Coli* сотрудниками отдела Биоинженерии ИБХ РАН (Гончарук М.В., Ткач Е.Н., Ермолюк С.А., Шульга А.А.), детали приводятся в работе [456]. Получены ^{15}N, $^{13}C/^{15}N$-меченые и немеченый образцы в мицеллах DPC и бицеллах DMPC/DHPC.

EGFRtm: остатки 633-677 EGFR человека (UNIPROT: P00533), синтезирован в культуре бактерий *E. Coli* сотрудниками отдела Структурной биологии ИБХ РАН (Пустовалова Ю.Е., Бочарова О.В.), детали приводятся в работе [471]. Получены ^{15}N, $^{13}C/^{15}N$-меченые и немеченый образцы в бицеллах DMPC/DHPC.

HER2tm: остатки 641-685 HER2 человека (UNIPROT: P04626), синтезирован в культуре бактерий *E. Coli* сотрудниками отдела Биоинженерии ИБХ РАН (Ткач Е.Н., Ермолюк С.А.),

детали приводятся в работе [536]. Получены ^{15}N, $^{13}C/^{15}N$-меченые и немеченый образцы в мицеллах DPC и бицеллах DMPC/DHPC.

HER3tm: остатки 639-670 с дополнительным N-концевым остатком Met человеческого белка HER3 (UNIPROT: P21860), синтезирован в бесклеточной системе сопряженных транскрипции и трансляции диализного типа сотрудниками отдела Биоинженерии ИБХ РАН (Хабибуллина Н.Ф., Люкманова Е.Н.), детали приводятся в работе [467]. Получены ^{15}N, $^{13}C/^{15}N$-меченые и немеченый образцы в мицеллах DPC.

HER4tm: остатки 642-685 HER4 человека (UNIPROT: Q15303), синтезирован в культуре бактерий *E. Coli* сотрудниками отдела Биоинженерии ИБХ РАН (Гончарук М.В.), детали приводятся в работе [536], а также с дополнительным N-концевым остатком Met в бесклеточной системе сопряженных транскрипции и трансляции диализного типа сотрудниками отдела Структурной Биологии ИБХ РАН (Брагин П.Е., Бочарова О.В.), детали приводятся в работе [519]. Получены ^{15}N, $^{13}C/^{15}N$-меченые и немеченый образцы в бицеллах DMPC/DHPC, DMPC/CHAPS, DLPC/CHAPS, DPPC/CHAPS, POPC/CHAPS.

VEGFR2tm: остатки 759-795 с дополнительным N-концевым остатком Met человеческого VEGFR2 (UNIPROT: P35968), синтезирован в бесклеточной системе сопряжённых транскрипции и трансляции диализного типа сотрудниками отдела Биоинженерии ИБХ РАН (Шулепко М.А, Люкманова Е.Н.), детали приводятся в работе [468]. Получены ^{15}N, $^{13}C/^{15}N$-меченые и немеченый образцы в мицеллах DPC.

VEGFR2tmV769E: VEGFR2tm с заменой V769E, синтезирован аналогично. Получены ^{15}N, $^{13}C/^{15}N$-меченые и немеченый образцы в мицеллах DPC.

VEGFR2tmG770EF778E: VEGFR2tm с двойной заменой G770E/F778E, синтезирован аналогично. Получены ^{15}N, $^{13}C/^{15}N$-меченые и немеченый образцы в мицеллах DPC.

TLR3tm: остатки 698-730 с дополнительным N-концевым остатком Met человеческого TLR3 (UNIPROT: O15455), синтезирован в бесклеточной системе сопряженных транскрипции и трансляции диализного типа сотрудником отдела Структурной Биологии ИБХ РАН (Гончарук С.А.), детали приводятся в работе [520]. Получены ^{15}N, $^{13}C/^{15}N$-меченые и немеченый образцы в мицеллах DPC и DPC/FOS-16.

TLR4tm: остатки 624-657 с дополнительным N-концевым остатком Met человеческого TLR4 (UNIPROT: O00206), интезирован в бесклеточной системе сопряженных транскрипции и трансляции диализного типа сотрудником отдела Структурной Биологии ИБХ РАН (Гончарук

С.А.), детали приводятся в работе [537]. Получены ^{15}N, $^{13}C/^{15}N$-меченые и немеченый образцы в мицеллах DPC.

TLR4tmhr: остатки 624-670 с дополнительным N-концевым остатком Met человеческого TLR4 (UNIPROT: O00206), интезирован в бесклеточной системе сопряженных транскрипции и трансляции диализного типа сотрудниками отдела Структурной Биологии ИБХ РАН (Гончарук С.А., Гончарук М.В.), детали приводятся в работе [537] Получены ^{15}N, $^{13}C/^{15}N$-меченые и немеченый образцы в мицеллах DPC, бицеллах DMPC/DHPC и DMPG/DHPC.

TrkAtm: остатки 410-447 с дополнительным N-концевым остатком Met человеческого TrkA (UNIPROT: P04629), синтезирован в бесклеточной системе сопряженных транскрипции и трансляции диализного типа сотрудником отдела Структурной Биологии ИБХ РАН (Гончарук С.А.), детали приводятся в работе [538]. Получены $^{15}N/^{2}H$, $^{13}C/^{15}N$-меченые образцы в мицеллах DPC, бицеллах DMPC/DHPC и DMPC/CHAPS.

p75tm: остатки 245-284 с дополнительным N-концевым остатком Met p75NTR крысы Rattus Norvegicus (UNIPROT: P07174), синтезирован в бесклеточной системе сопряженных транскрипции и трансляции диализного типа сотрудником отдела Структурной Биологии ИБХ РАН (Гончарук С.А.), детали приводятся в работе [522]. Получены ^{15}N, $^{13}C/^{15}N$-меченые и немеченый образцы в мицеллах DPC.

ТМД-ЦПР-А EGFR: остатки 642-690 человеческого EGFR (UNIPROT: P00533), синтезирован в культуре бактерий *E. Coli* сотрудником отдела Структурной Биологии ИБХ РАН (Бочарова О.В.), детали приводятся в работе [452]. Получены ^{15}N, $^{13}C/^{15}N$-меченые образцы в мицеллах DPC, бицеллах DMPC/DHPC.

ТМД-ЦПР-А HER2: остатки 644-700 с дополнительным N-концевым остатком Met человеческого HER2 (UNIPROT: P04626), синтезирован в бесклеточной системе сопряженных транскрипции и трансляции диализного типа сотрудниками отдела Структурной Биологии ИБХ РАН (Брагин П.Е., Бочарова О.В.), детали приводятся в работе [539]. Получены ^{15}N, $^{13}C/^{15}N$-меченые образцы в мицеллах DPC, бицеллах DMPC/DHPC.

ТМД-чоппер p75: остатки 245-308 с дополнительным N-концевым остатком Met p75NTR крысы Rattus Norvegicus (UNIPROT: P07174), синтезирован в бесклеточной системе сопряженных транскрипции и трансляции диализного типа сотрудником отдела Структурной Биологии ИБХ РАН (Гончарук С.А.), детали приводятся в работе [540]. Получены ^{15}N, $^{13}C/^{15}N$-меченые образцы в мицеллах DPC, бицеллах DMPC/DHPC, ЛБН DMPC/DMPG/MSP1D1.

p75-ΔECD: остатки 245-425 p75NTR крысы Rattus Norvegicus (UNIPROT: P07174) с дополнительным полигистидиновым тагом, последовательностью GSGSGS и сайтом узнавания протеазы тромбин (LVPRGS), синтезирован в культуре бактерий *E. Coli* сотрудником отдела Структурной Биологии ИБХ РАН (Гончарук С.А.), детали приводятся в работе [540]. Получены ^{15}N, ^{15}N/^{2}H, ^{13}C/^{15}N-меченые образцы в мицеллах DPC, бицеллах DMPC/DHPC, DMPC/CHAPS, DMPC/Facade-EM, DMPC/Facade-EPC, ЛБН DMPC/DMPG/MSP1D1, DMPG/MSP1D1, POPC/MSP1D1, DMPC/DMPG/MSP1D1ΔH5 и DMPC/DMPG/MSP1D1ΔH4-6.

p75-ЦПД: остатки 288-425 p75NTR крысы Rattus Norvegicus (UNIPROT: P07174) с дополнительным полигистидиновым тагом, последовательностью GSGSGS и сайтом узнавания протеазы тромбин (LVPRGS), синтезирован в культуре бактерий *E. Coli* сотрудником отдела Структурной Биологии ИБХ РАН (Гончарук С.А.), детали приводятся в работе [452]. Получены ^{15}N-меченые образцы водном буфере.

NRADD: Полноразмерный белок NRADD 1-228 крысы Rattus Norvegicus (UNIPROT: Q8K5A9) с дополнительным полигистидиновым тагом, последовательностью GSGSGS и сайтом узнавания протеазы тромбин (LVPRGS), синтезирован в бесклеточной системе сопряженных транскрипции и трансляции диализного типа сотрудником отдела Структурной Биологии ИБХ РАН (Гончарук С.А.), детали приводятся в работе [541]. Получены ^{15}N, ^{13}C/^{15}N-меченые образцы в бицеллах DMPC/CHAPS и ЛБН DMPC/MSP1D1.

MSP1D1/MSP1D1ΔH5/MSP1D1ΔH4-6 варианты белка MSP для сборки ЛБН были синтезированы в культуре бактерий *E. Coli* сотрудниками отдела Структурной Биологии ИБХ РАН (Кузмичев П.К., Гончарук С.А.), в соответствии с протоколом, описанным в работах [42,113].

8.2. Приготовление образцов

Для приготовления образцов ТМД в мембраноподобных средах, за исключением оговоренных отдельно случаев, применялся следующий протокол. Очищенный препарат белка растворяли в смеси ТФЭ/вода 2:1 (если растворимость белка была недостаточной в смесь добавляли 0.1% трифторуксусной кислоты), контролировали концентрацию белка при помощи спектроскопии ЯМР относительно сигнала 1мМ TSP в 0.0 м.д.. Полученной смесью растовряли необходимое количество липидов/детергентов, затем небольшими порциями доводили содержание воды до 50%, центрифугировали, супернатант отбирали и замораживали в жидком азоте с последующей лиофильной сушкой в течение 16-24 часов. Полученый порошок растворяли в водном буфере, подводили pH, добавляли 0.1% NaN_3 и 1 мМ EDTA.

В случае TLR4tmhr очищенный препарат белка растворяли в 100% ГФИП (если растворимость белка была недостаточной в смесь добавляли до 5% воды), контролировали концентрацию белка при помощи спектроскопии ЯМР относительно сигнала 1мМ TSP в 0.0 м.д. Полученной смесью растворяли необходимое количество липидов/детергентов, затем небольшими порциями доводили содержание воды до 70%, центрифугировали, супернатант отбирали и замораживали в жидком азоте с последующей лиофильной сушкой в течение 16-24 часов. Полученый порошок растворяли в водном буфере, подводили pH, добавляли 0.1% NaN_3 и 1 мМ EDTA.

В случае p75-ΔECD и NRADD для приготовления бицелл белок после растворения в LS иммобилизировали на афинной Ni+ колонке, которую затем промывали CHAPS 10мМ с 0.5 М имидазолом. Полученный раствор несколько раз разбавляли водным буфером с 5 мМ DTT и концентрировали, чтобы избавиться от излишков имидазола, концентрацию белка контролировали спектрофотометрически, концентрацию CHAPS определяли по спектрам ЯМР. Затем, в образец добавляли необходимое количество 10% раствора DMPC, до получения расчетного отношения q. Схожие процедуры применяли для получения образца белков в мицеллах DPC и бицеллах DMPC/DHPC.

Для приготовления образцов p75-ΔECD и NRADD в ЛБН к раствору белка в LS добавляли 10% раствор липидов в нужном соотношении липид/белок, белок MSP или его аналог в 1% холиевой кислоте. Затем, из раствора удаляли детергент при помощи смолы BioBeads в течение 8-16 ч, отсутствие детергента в финальном образце контролировали при помощи ЯМР. После этого, убедившись в образовании ЛБН, проводили афинную хроматографию, для удаления частиц ЛБН без белка.

Для приготовления образца p75-ΔECD в липосомах DMPC, к белку в мицеллах LS было добавлено требуемое количество липидов, после чего образец встряхивался в течение 15 минут. Затем, проводился 1000-кратный диализ против водного буфера (10 mM Tris, pH 8.0) в течение 6 дней с заменой буфера 1 раз в день. При каждой смене растворе содержание LS контролировали по спектрам ЯМР. Для этого 5 мкл аликвоту образца растворяли в смеси хлороформ/метанол 1:1 с добавлением 1 мкл 100 мМ раствора TSP и записывали ^1H спектр ЯМР. Концентрацию липида и LS определяли по интегралам пиков от $N\text{-}CH_3$ групп в районе 3.2-2.8 м.д.

Для приготовления образцов бицелл, необходимые количества 10% растворов липидов и детергентов смешивались в пробирке и объем смеси подводился до 500 мкл водным буфером с pH=7. Затем образцы или встряхивались при температуре выше критической точки липида в

течение 20-30 минут или подвергались 3-5 циклам замораживания в жидком азоте/оттаивания в ультразвуковой бане при температуре 50 ºС. Стандартные навески липидов составляли 10-20 мг на 500 мкл раствора. Чаще всего для каждого q смеси приготавливался отдельный образец. В случае детергентов Facade, которые относительно дороги, применялось титрование - к начальному образцу добавлялись аликвоты стокового раствора липида в многослойных липосомах.

Для приготовления образцов бицелл с включением холестерина, холестерин смешивали с липидом в хлороформе, упаривали на концентраторе, а затем высушивали в течение 16 часов на лиофильной сушке. Полученный порошок заливали раствором ободообразующего агента и перемешивали в течение 20 минут при температуре 40 ºС.

8.3. Спектроскопия ЯМР

Все спектры ЯМР регистрировались на ЯМР-спектрометрах производства Bruker Biospin, Германия: Avance III 600 МГц, Avance III 800 МГц, Avance 700 Мгц. Спектрометры оборудованы сверхчувствительными четырехканальными криогенными датчиками тройного резонанса (H/C/N/D). Для регистрации спектров тройного резонанса применялись методы BEST [326] и BEST-TROSY [328], задержка между сканами составляла 0.2-0.4 с, в зависимости от свойств образца. Многие трехмерные спектры, в том числе NOESY регистрировались с использованием неоднородной выборки точек в непрямых направлениях спектра [336], преобразование таких спектров осуществлялось в программном обеспечении qMDD [337]. При этом применялась схема выборки с экспоненциальным распределением точек для оптимизации чувствительности с учётом поперечной релаксации, в спектрах тройного резонанса дополнительно учитывалась константа $^{1}J_{C\alpha C\beta}$ = 35 Гц.

Спектры ^{31}P регистрировались на спектрометре с рабочей частотой по протонам 600 МГц, оборудованном широкополосным датчиком BBO двойного резонанса. Использовался простейший одноимпульсный эксперимент с импульсом $\pi/6$ длительностью 4 мкс и задержкой на релаксацию 3с, временем накопления 2.7 с широкополосной развязкой от протонов со схемой WALTZ16 с мощностью магнитного поля 1.42 кГц. Перед каждым экспериментом производилась задержка 10 минут, чтобы обеспечить равновесное состояние системы. Химические сдвиги ^{31}P определялись непрямым способом, пересчётом из гиромагнитных соотношений частоты ^{1}H, определённой по внутреннему стандарту TSP (0.0 м.д.). Для определения химических сдвигов и заселенностей форм липидов применялась деконволюция спектров лоренцевыми линиями методом нелинейной регрессии. Температура системы

варьировалась в обоих направлениях, чтобы исключить явления гистерезиса и контролировать обратимость процессов в исследуемых системах.

8.3.1. Измерение коэффициентов самодиффузии

Измерения диффузии ^{1}H проводилось с использованием последовательности PGSTE-WATERGATE [419], в которой реализовано одновременное подавление конвекции и сигнала растворителя. При этом использовалась постоянная задержка на диффузию Δ=300-400 мс, длительность кодирующего градиента δ=3-4 мс. Для измерения диффузии мощность кодирующего градиента варьировалась от 12 до 52 Г/см в 32 итерации. Зависимость интенсивности сигнала от мощности градиента магнитного поля имела вид:

$$I = I_0 \exp\left[-2\gamma^2 D \delta^2 \left\{\left(\Delta - \frac{8}{3}\delta - 4\delta_2\right) g^2 + \frac{4}{3}\delta g_1 g + \left(8\delta_2 + \frac{8}{3}\delta\right) g_1^2\right\}\right] \quad (33),$$

где γ – гиромагнитное соотношение для протонов, D – коэффициент диффузии, g=g1-g2 – эффективная мощность импульсного градиента, g1 - мощность кодирующего градиента, δ_2 - длительность одной из задержек импульсной последовательности. Для серийной обработки спектров было создано программное обеспечение в среде Wolfram Mthematica. Ошибки коэффициентов самодиффузии рассчитывались либо как среднеквадратичное отклонение при проведении нескольких повторных измерений, либо методом Монте-Карло из уровня теплового шума в спектрах ЯМР.

Для оценки достоверности получаемых результатов измерения проводились с шестью повторениями, в качестве критерия достоверности применялась p-величина, рассчитанная по тесту Стьюдента. Мощность градиентов была откалибрована по коэффициенту диффузии остаточной воды в образце 99.9% D_2O при 25 ºС. При измерении радиусов бицелл на основе CHAPS для анализа использовалась амплитуда сигналов от N-CH_3 групп липидов и детергентов в районе 3.0-3.2 м.д., при исследованиях бицелл на основе DHPC и DH_7PC применялись сигналы от метильных групп детергента и липида в районе 0.96 и 0.85 м.д. соответственно. Для достижения равновесия системы после смены температуры перед регистрацией очередного спектра ЯМР производилась задержка 20-30 минут.

Диффузия по ^{31}P измерялась с использованием последовательности DSTE [418], в которой реализовано подавление эффектов конвекции с задержкой Δ=500 мс и длительностью кодирующего градиента δ=5 мс. Мощность кодирующего градиента варьировалась от 1 до 52 Г/см в 32 итерации. Общее время накопления такого эксперимента составляло не менее 8 часов.

Последовательность включала развязку от протонов со схемой WALTZ16 с мощностью магнитного поля 1.42 кГц как во время задержки на релаксацию, так и во время детекции. Для анализа данных применяли одновременную деконволюцию лоренцевыми линиями и аппроксимацию спада интенсивностей в спектре зависимостью:

$$I = I_0 \exp\left[-\gamma^2 D g^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{1}{3}\delta\right)\right] \quad (34).$$

При этом считалось, что положения сигналов и их полуширины не изменяются в зависимости от силы градиента. Такой подход позволяет значительно уменьшить ошибку измерения за счет одновременного анализа всех экспериментальных точек. Измерения диффузии производили в шесть последовательных повторений для определения случайных ошибок и проведения статистического анализа результатов.

8.3.2. Отнесение сигналов

Отнесение сигналов в спектрах ЯМР проводилось по стандартной методике для $^{13}C/^{15}N$-меченых белков в программе CARA [542]. Спиновые системы идентифицировались в спектре HNCO и затем объединялись в цепочки по межостаточным корреляциям. Для поиска корреляций в ТМД использовались спектры HNCA, HNcoCA, HNcaCO и 3D $^{1}H,^{15}N$-NOESY-HSQC. В крупных фрагментах МБ дополнительно регистрировались спектры HNCACB и CBCAcoNH. Для отнесения сигналов боковых цепей применяли спектры $^{1}H,^{13}C$-NOESY-HSQC, $^{1}H,^{13}C$-NOESY-CT-HSQC, HCCH-TOCSY и CT-HCCH-TOCSY [543]. Для отнесения сигналов ароматических остатков применялись подходы на основе TROSY ароматических остатков, HCCH-COSY-TROSY [300] и эксперимента hbCbcgcccH [544].

8.3.3. Анализ и определение пространственной структуры

Расчет пространственной структуры белков осуществлялся в программе CYANA версий 2.1 или 3.9 методом симулированного отжига в пространстве торсионных углов с псевдо-потенциалами [545]. Ограничения на внутримолекулярные расстояния были получены из спектров NOESY-HSQC, ограничения на межмолекулярные расстояния измерялись из спектров NOESY с гетероядерной фильтрацией по ^{13}C [454]. Чтобы учесть различную скорость релаксации амидных групп, интенсивность кросс-пиков в спектрах ^{15}N-NOESY-HSQC была нормирована на интенсивность соответствующего диагонального пика. Поскольку далеко не все кросс-пики NOESY можно однозначно отнести, применялись так называемые "множественные ограничения" CYANA, когда одному пику в спектре ставились в соответствие несколько возможных расстояний. В случае если олигомерной форме соответствовал один набор сигналов,

состояние считалось симметричным и производилось симметризация набора межмолекулярных контактов. Ограничения на углы основной цепи получались из анализа химических сдвигов в программе TALOS-N [343], а также в ряде случаев по J-количественному спектру 3D HNHA, в котором из отношения интенсивностей кросс-пика и диагонального пика можно измерить вицинальную константу $^{3}J_{HNH\alpha}$ с применением коррекции на продольную релаксацию [228]. Конформация боковых цепей некоторых остатков определялась на основании вицинальных констант $^{3}J_{C\gamma C'}$ и $^{3}J_{C\gamma N}$, измеренных методом спин-эхо с различным положением рефокусирующих импульсов в задержке на постоянную эволюцию по ^{13}C [229,230]. Ограничения на водородные связи вводились на финальных стадиях расчета структуры на основе данных кинетики обмена амидных протонов на дейтерий растворителя. Протоны с характерным временем обмена более 30 минут считались участниками водородных связей.

8.3.4. Измерение параметров ЯМР-релаксации

Для измерения сокростей продольной и поперечной релаксации ^{15}N использовали псведо трехмерные эксперименты на основе HSQC, задержка на релаксацию в импульсной последовательности варьировалась между точками случайным образом, регистрация спектра проходила в режиме "перемешивания" [507]. Задержка между накоплениями составляла не менее 3 с. Для измерения гетероядерного ЯЭО применяли два спектра HSQC, в одном из которых в течение 3с производилось преднасыщение протонов, а в другом - нет [507]. За величину ЯЭО считалось отношение интенсивностей сигналов. Для измерения скорости кросс-скорелированной релаксации амидных групп η_{xy} применяли два спектра на основе CT-TROSY [299], с задержкой Δ либо 5.4 мс либо 10.8 мс, в зависимости от температуры и размера системы, в которых отличалось положение рефокусирующих импульсов по протонам внутри задержки на постоянную эволюцию. Спектры регистрировались в режиме "перемешивания", чтобы избежать вклада от изменений спектра, происходящих со временем (преципитация образцов и пр.). Величина η_{xy} расчитывалась по формуле:

$$\eta_{xy} = \frac{\log\left[I/I_0\right]}{4\Delta} \qquad (35).$$

Измерение релаксации метильных групп проводилось на спектрометре с рабочей частотой по протонам 800 МГц. Продольная релаксация была измерена с использованием подхода, предложенного Carlomagno с соавторами [475] с добавлением градиентного блока для подавления эффекта диполь-дипольной кросс-скорелированной релаксации CH-CH [476]. По непрямому направлению использовалась детекция с постоянной задержкой, перед задержкой на

релаксацию, для предотвращения кросс-релаксации ^{13}C-^{13}C [474]. Значения R_1 были получены аппроксимацией зависимости интенсивности сигнала от длительности задержки моноэкспоненциальным спадом. Вклад од диполь-дипольной кросс-скорелированной релаксации CH-CH в поперечную релаксацию, Γ_2, был измерен в соответствии с работой [473] с потоянной задержкой длительностью N*14.3 мс (N=2-4), в наборе из 14 двумерных спектров, где задержка на эволюцию Δ варьировалась от 0.01 до 9.2 мс. Задержки между накоплениями составили 1.5 с, все эксперименты регистрировались в режиме "перемешивания", как для измерения R_1, так и для измерения Γ_2.

8.3.5. Измерение pKa ионогенных групп

Для измерения констант диссоциации pKa ионогенных групп остатков Asp, Glu и His проводили эксперименты по титрованию. pH раствора варьировался от 4 до 8, при этом отслеживался химический сдвиг ядер $^{13}C\gamma$ Glu, $^{13}C\beta$ Asp и $^{1}H\varepsilon1$ His. В случае большого количества ионогенных групп и перекрытия сигналов от $^{13}C\gamma$ Glu использовался химический сдвиг амидных протонов соответствующих остатков. Зависимость хим. сдвига от pH аппроксимировалась уравнением Хилла [546]:

$$\delta_i = \frac{\delta_a + \delta_b 10^{n(pKa - pH)}}{1 + 10^{n(pKa - pH)}} \qquad (36),$$

где δ_i - измеренный химический сдвиг, δ_a и δ_b - химические сдвиги ампинокислоты в полностью протонированной и депротонированной форме, а n - коэффициент Хилла.

8.3.6. Измерение энергии димеризации

Для измерения свободной энергии димеризации образец белка разбавляли стоковым растовром мицелл/бицелл. Раствор бицелл готовили таким образом, чтобы учесть наличие детергента в мономерной форме в соответствии с таблицами 2-5. Для измерения заселенностей олигомерных форм использовали спектры BEST-TROSY [327] с задержкой между накоплениями 0.8 с, что в 3-4 раза превышает время продольной релаксации амидных протонов при селективном возбуждении в экспериментах типа BEST.

8.4. Расчёты.

Анализ параметров ЯМР-релаксации, коэффициентов диффузии проводился в программной среде Wolfram Mathematica. Измерение расстояний, манипуляции со списками кросс-пиков проводились с использованием собственноручно написанных программ на языке C++. Анализ свойств поверхности ТМ α-спиралей проводился с использованием молекулярного

гидрофобного потенциала и ПО Platinum [526]. Предсказание упаковки димеров ТМД проводилось в программах PREDDIMER [478] и TMDOCK [477]. Валидация пространственных структур проводилась в программе PROCHECK [547]. Анализ параметров структур, интерфейса димеризации ТМД, расчет площади поверхности, проводился в программах MOLMOL и на сервере PDBsum (www.ebi.ac.uk/pdbsum/).

8.5. Иллюстрации.

Изображения трехмерных структур белков выполнены с использованием бесплатных пакетов PYMOL и MOLMOL [548]. Все изображения обрабатывались в бесплатных графических редакторах InkScape 0.96 и GIMP 3.2.

8.6. Базы данных.

Для всех пространственных структур, полученных в данной работе отнесение химических сдвигов, а также данные ЯМР-спектроскопии были помещены в базу данных BMRB (www.bmrb.wisc.edu). Все пространственные структуры помещены в базу данных PDB (www.rcsb.org).

ВЫВОДЫ

1. Разработан подход для изучения структуры частиц в смесях липид/детергент. Показано, что в бицеллах малого размера фосфолипиды претерпевают фазовый переход между гелевым и жидкокристаллическим состояниями, что подтверждает наличие в них липидного бислоя. Липиды в бицеллах воспроизводят поведение липидов в бислоях и липид/белковых нанодисках. В непосредственной близости от трансмембранного белка в бицеллах находятся преимущественно фосфолипиды.

2. Измерены параметры бицелл из различных липидов и детергентов. Показано, что малые изотропные бицеллы не могут быть образованы при использовании анионных липидов, фосфатидилэтаноламина, смесей сфингомиелина с холестерином. Частицы корректной формы получаются на основе фосфатидилхолина, в том числе в смеси с анионными липидами до 1:1 и холестерином до 9:1, сфингомиелина.

3. Предложены бицеллы на основе детергентов Façade-EM и Façade-EPC с повышенной температурной стабильностью. Использование Façade-EM позволяет получать нативно свёрнутые мембранные белки, содержащие глобулярные водорастворимые домены.

4. Разработана методика определения структуры димеров ТМ доменов МБ на основе ЯМР-спектроскопии. Получены 12 пространственных структур димеров и две структуры тримеров МБ. Результаты исследования позволили расширить представления о движущих силах спираль-спиральных взаимодействий в МБ, идентифицировать параметры активного и неактивного состояний димеров ТМД РТК, предложить новые механизмы активации рецепторов.

5. Изучена предсказательная сила различных параметров ЯМР амидных и метильных групп МБ в отношении интерфейсов димеризации. Показано, что химические сдвиги метильных групп имеют ограниченную предсказательную силу, а скорость вращения метильных групп вокруг оси CC' является надёжным индикатором интерфейсов димеризации. Разработан подход для построения моделей димеров МБ на основании изменений параметров метильных групп, который был применён для анализа структуры димера ТМД TLR4. Построена первая модель полноразмерного TLR в димерном состоянии, основанная на экспериментальных данных о конформации всех трёх доменов рецептора.

6. Разработана методика для определения свободной энергии димеризации и олигомеризации МБ в мицеллах и бицеллах. Методика имеет ряд преимуществ перед аналогами. С применением методики найден механизм запуска спонтанной активации VEGFR2 точечными заменами неполярных аминокислот на Glu в ТМ домене. Изучено влияние состава липидного окружения

на структуру и стабильность димера ТМД. Измерена свободная энергия димеризации 11 белков.

7. Исследована структура и динамика ТМД EGFR, HER2, TLR4 и p75NTR с цитоплазматическими примембранными регионами. Показано, что наличие примембранных регионов может влиять на структуру ТМ домена. Домен "чоппер" p75 NTR неструктурирован и не взаимодействует с мембраной, а гидрофобный примембранный регион TLR4 на самом деле является частью трансмембранного домена рецептора.

8. Исследована структура и динамика конструкции, содержащей ТМ и внутриклеточный домен рецептора p75NTR (21 кДа), а также полноразмерного ТМ белка NRADD (25 кДа). Показано, что эктодомен NRADD, а также цитоплазматические примембранные участки длиной в 70 а.о. NRADD и p75 являются высокоподвижными и неупорядоченными и не взаимодействуют с поверхностью липидной мембраны. Движения домена смерти p75 никак не сцеплены с движениями трансмембранного домена белка, как в мономерной, так и в димерной форме, что опровергает принятый ранее механизм активации рецептора.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- а.к. - аминокислота
- а.о. - аминокислотный остаток
- АУЦ - аналитическое ультрацентрифугирование
- АЭП - аспарагинилэндопептидаза
- ДС - домен смерти
- ДСР - динамическое светорассеяние
- ж.-к. - жидко-кристаллический
- ИК - инфракрасный
- КССВ - константа спин-спинового взаимодействия
- ЛБН - липид-белковые нанодиски
- ЛИД - лиганд-индуцированная димеризация
- МБ - мембранный белок
- МБ-1 - мембранный белок с 1 трансмембранным сегментом, мембранный белок I типа, битопный мембранный белок
- м.д. - миллионная доля
- млрд. д. - миллиардная доля
- ММД - многомерная декомпозиция
- МПС - мембраноподобная среда
- РТК - рецепторная тирозинкиназа
- СВ - сцепленное вращение
- СМ - сфингомиелин
- ТЗР - температурно-зависимый рост бицелл
- ТМ - трансмембранный
- ТМД - трансмембранный домен

- УФ - ультрафиолетовый
- ФХ - фосфатидилхолин
- ФЭ - фосфатидилэтаноламин
- ХГС - холестерина гемисукцинат
- ЦПД - цитоплазматический домен
- ЦПР - цитоплазматический примембранный регион
- ЭМ - электронная микроскопия
- ЯЭО - ядерный эффект Оверхаузера
- CHAPS - 3-[(3-холамидопропил)-диметиламмонио]-1-пропансульфонат
- CHAPSO - 3-[(3-холамидопропил)-диметиламмонио]-2-гидрокси-1-пропансульфонат
- DM - децил мальтозид
- DDM - додецил мальтозид
- DH_7PC - дигептаноилфосфатидилхолин
- DHPC - дигексаноилфосфатидилхолин
- DLPC - дилауроилфосфатидилхолин
- DMPC - димиристоилфосфатидилхолин
- DMPE - димиристоилфосфатидилэтаноламин
- DMPG - димиристоилфосфатидилглицерин
- DMPS - димиристоилфосфатидилсерин
- DPC - додецилфосфохолин
- DPPC - дипальмитоилфосфатидилхолин
- FRET - индуктивно-резонансный перенос энергии флюоресценции
- GPCR - G-белок сопряженный рецептор
- HMQC - гетероядерная многоквантовая корреляционная спектроскопия
- HSQC - гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия

- INEPT - англ. , Insensitive Nuclei Enhanced Polarization Transfer, улучшенный перенос поляризации на нечувствительные ядра
- ITC - англ. isotermic titration calorimetry, изотермическая титрационная калориметрия
- LDAO - лаурилметиламин-N-оксид
- LPPG - лизопальмитоилфосфатидилглицерин
- LPR - молярные соотношение липид/белок
- MNG - мальтозида неопентилгликоль
- MSP - membrane scaffold protein, белок мембранного скаффолда
- NOESY - спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера
- PIP - фосфатидилинозитолфосфат
- PE - фосфатидилэтаноламин
- POPC - пальмитоилолеоилфосфатидилхолин
- SAIL - англ. stereo-array isotope labeling, стереоспецифическое изотопное мечение
- SMA - сополимер стирола и малеиновой кислоты
- TROSY - англ. Transverse Relaxation Optimized SpectroscopY, спектросокпия с оптимизированной поперечной релаксацией
- β-DDMe - β-додецилмелибиозид

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shimizu K. et al. Comparative analysis of membrane protein structure databases // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2018. Vol. 1860, № 5. P. 1077–1091.
2. van Spriel A.B., van den Bogaart G., Cambi A. Editorial: Membrane domains as new drug targets // Frontiers in Physiology. 2015. Vol. 6.
3. Ishchenko A., Abola E.E., Cherezov V. Crystallization of Membrane Proteins: An Overview // Methods Mol. Biol. 2017. Vol. 1607. P. 117–141.
4. Gabriel N.E., Roberts M.F. Spontaneous formation of stable unilamellar vesicles // Biochemistry. 1984. Vol. 23, № 18. P. 4011–4015.
5. Gabriel N.E., Roberts M.F. Interaction of short-chain lecithin with long-chain phospholipids: characterization of vesicles that form spontaneously // Biochemistry. 1986. Vol. 25, № 10. P. 2812–2821.
6. Denisov I.G., Sligar S.G. Nanodiscs for structural and functional studies of membrane proteins // Nature Structural & Molecular Biology. 2016. Vol. 23, № 6. P. 481–486.
7. Dürr U.H.N., Gildenberg M., Ramamoorthy A. The Magic of Bicelles Lights Up Membrane Protein Structure // Chemical Reviews. 2012. Vol. 112, № 11. P. 6054–6074.
8. Elter S. et al. The use of amphipols for NMR structural characterization of 7-TM proteins // J. Membr. Biol. 2014. Vol. 247, № 9–10. P. 957–964.
9. Sanders C.R., Sönnichsen F. Solution NMR of membrane proteins: practice and challenges // Magnetic Resonance in Chemistry. 2006. Vol. 44, № S1. P. S24–S40.
10. Warschawski D.E. et al. Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins // Biochim. Biophys. Acta. 2011. Vol. 1808, № 8. P. 1957–1974.
11. Barsukov I.L. et al. Three-dimensional structure of proteolytic fragment 163-231 of bacterioopsin determined from nuclear magnetic resonance data in solution // Eur. J. Biochem. 1992. Vol. 206, № 3. P. 665–672.
12. Grabchuk I.A. et al. 1H-15N NMR signal assignment and the secondary structure of bacteriorhodopsin(1-231) in solution // Bioorg. Khim. 1997. Vol. 23, № 8. P. 616–629.
13. Pervushin K.V. et al. Three-dimensional structure of (1-71)bacterioopsin solubilized in methanol/chloroform and SDS micelles determined by 15N-1H heteronuclear NMR spectroscopy // Eur. J. Biochem. 1994. Vol. 219, № 1–2. P. 571–583.
14. Girvin M.E. et al. Solution structure of the transmembrane H+-transporting subunit c of the F1F0 ATP synthase // Biochemistry. 1998. Vol. 37, № 25. P. 8817–8824.
15. Cohen L.S. et al. Comparative NMR analysis of an 80-residue G protein-coupled receptor fragment in two membrane mimetic environments // Biochim. Biophys. Acta. 2011. Vol. 1808, № 11. P. 2674–2684.
16. Mortishire-Smith R.J. et al. Solution structure of the cytoplasmic domain of phopholamban: phosphorylation leads to a local perturbation in secondary structure // Biochemistry. 1995. Vol. 34, № 23. P. 7603–7613.
17. Jung H. et al. NMR and circular dichroism studies of synthetic peptides derived from the third intracellular loop of the beta-adrenoceptor // FEBS Lett. 1995. Vol. 358, № 2. P. 133–136.
18. Shenkarev Z.O. et al. Isolation, structure elucidation, and synergistic antibacterial activity of a novel two-component lantibiotic lichenicidin from Bacillus licheniformis VK21 // Biochemistry. 2010. Vol. 49, № 30. P. 6462–6472.
19. Tulumello D.V., Deber C.M. Efficiency of detergents at maintaining membrane protein structures in their biologically relevant forms // Biochim. Biophys. Acta. 2012. Vol. 1818, № 5. P. 1351–1358.
20. Arseniev A.S. et al. ^{1}H-NMR study of gramicidin A transmembrane ion channel: Head-to-head right-handed, single-stranded helices // FEBS Lett. 1985. Vol. 186, № 2. P. 168–174.

21. Lomize A.L., Pervushin K.V., Arseniev A.S. Spatial structure of (34–65)bacterioopsin polypeptide in SDS micelles determined from nuclear magnetic resonance data // Journal of Biomolecular NMR. 1992. Vol. 2, № 4. P. 361–372.
22. Chill J.H. et al. NMR study of the tetrameric KcsA potassium channel in detergent micelles // Protein Science. 2006. Vol. 15, № 4. P. 684–698.
23. Chill J.H. et al. Measurement of 15N relaxation in the detergent-solubilized tetrameric KcsA potassium channel // J Biomol NMR. 2006. Vol. 36, № 2. P. 123–136.
24. Chill J.H. et al. Local and global structure of the monomeric subunit of the potassium channel KcsA probed by NMR // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2007. Vol. 1768, № 12. P. 3260–3270.
25. Krishnamani V. et al. Secondary and Tertiary Structure of Bacteriorhodopsin in the SDS Denatured State // Biochemistry. 2012. Vol. 51, № 6. P. 1051–1060.
26. Gong X.-M. et al. Structure of the Na,K-ATPase regulatory protein FXYD2b in micelles: implications for membrane-water interfacial arginines // Biochim. Biophys. Acta. 2015. Vol. 1848, № 1 Pt B. P. 299–306.
27. Li Y. et al. Structure of a conserved Golgi complex-targeting signal in coronavirus envelope proteins // J. Biol. Chem. 2014. Vol. 289, № 18. P. 12535–12549.
28. Miyamoto K., Togiya K. Solution structure of LC4 transmembrane segment of CCR5 // PLoS ONE. 2011. Vol. 6, № 5. P. e20452.
29. Schubert M. et al. Heteronuclear Multidimensional NMR Spectroscopy of Solubilized Membrane Proteins: Resonance Assignment of Native Bacteriorhodopsin // ChemBioChem. 2002. Vol. 3, № 10. P. 1019–1023.
30. Etzkorn M. et al. Cell-free expressed bacteriorhodopsin in different soluble membrane mimetics: biophysical properties and NMR accessibility // Structure. 2013. Vol. 21, № 3. P. 394–401.
31. Isogai S. et al. Backbone NMR reveals allosteric signal transduction networks in the β1-adrenergic receptor // Nature. 2016. Vol. 530, № 7589. P. 237–241.
32. Nygaard R. et al. The Dynamic Process of β2-Adrenergic Receptor Activation // Cell. 2013. Vol. 152, № 3. P. 532–542.
33. Stehle J. et al. Characterization of the simultaneous decay kinetics of metarhodopsin states II and III in rhodopsin by solution-state NMR spectroscopy // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2014. Vol. 53, № 8. P. 2078–2084.
34. Ozawa S. et al. Structural basis for the inhibition of voltage-dependent K+ channel by gating modifier toxin // Scientific Reports. 2015. Vol. 5. P. 14226.
35. Horst R. et al. β_2-adrenergic receptor activation by agonists studied with ^{19}F NMR spectroscopy // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2013. Vol. 52, № 41. P. 10762–10765.
36. Thompson A.A. et al. GPCR stabilization using the bicelle-like architecture of mixed sterol-detergent micelles // Methods. 2011. Vol. 55, № 4. P. 310–317.
37. Chae P.S. et al. Maltose–neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins // Nature Methods. 2010. Vol. 7, № 12. P. 1003–1008.
38. Hutchison J.M. et al. Dodecyl-β-melibioside Detergent Micelles as a Medium for Membrane Proteins // Biochemistry. 2017. Vol. 56, № 41. P. 5481–5484.
39. Cho K.H. et al. Maltose neopentyl glycol-3 (MNG-3) analogues for membrane protein study // The Analyst. 2015. Vol. 140, № 9. P. 3157–3163.
40. Krueger-Koplin R.D. et al. An evaluation of detergents for NMR structural studies of membrane proteins // J. Biomol. NMR. 2004. Vol. 28, № 1. P. 43–57.
41. Lyukmanova E.N. et al. Lipid-protein nanodiscs for cell-free production of integral membrane proteins in a soluble and folded state: comparison with detergent micelles, bicelles and liposomes // Biochim. Biophys. Acta. 2012. Vol. 1818, № 3. P. 349–358.
42. Hagn F. et al. Optimized phospholipid bilayer nanodiscs facilitate high-resolution structure determination of membrane proteins // J. Am. Chem. Soc. 2013. Vol. 135, № 5. P. 1919–1925.

43. MacKenzie K.R., Prestegard J.H., Engelman D.M. A transmembrane helix dimer: structure and implications // Science. 1997. Vol. 276, № 5309. P. 131–133.
44. Hiller S. et al. Solution Structure of the Integral Human Membrane Protein VDAC-1 in Detergent Micelles // Science. 2008. Vol. 321, № 5893. P. 1206–1210.
45. Sulistijo E.S., Mackenzie K.R. Structural basis for dimerization of the BNIP3 transmembrane domain // Biochemistry. 2009. Vol. 48, № 23. P. 5106–5120.
46. Shenkarev Z.O. et al. NMR Structural and Dynamical Investigation of the Isolated Voltage-Sensing Domain of the Potassium Channel KvAP: Implications for Voltage Gating // J. Am. Chem. Soc. 2010. Vol. 132, № 16. P. 5630–5637.
47. Bayrhuber M. et al. Structure of the human voltage-dependent anion channel // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008. Vol. 105, № 40. P. 15370–15375.
48. Van Horn W.D. et al. Solution Nuclear Magnetic Resonance Structure of Membrane-Integral Diacylglycerol Kinase // Science. 2009. Vol. 324, № 5935. P. 1726–1729.
49. Arora A. et al. Structure of outer membrane protein A transmembrane domain by NMR spectroscopy // Nat. Struct. Biol. 2001. Vol. 8, № 4. P. 334–338.
50. Bondarenko V. et al. NMR structures of the transmembrane domains of the α4β2 nAChR // Biochim. Biophys. Acta. 2012. Vol. 1818, № 5. P. 1261–1268.
51. Mowrey D.D. et al. Insights into distinct modulation of α7 and α7β2 nicotinic acetylcholine receptors by the volatile anesthetic isoflurane // J. Biol. Chem. 2013. Vol. 288, № 50. P. 35793–35800.
52. Yu L. et al. Nuclear magnetic resonance structural studies of a potassium channel-charybdotoxin complex // Biochemistry. 2005. Vol. 44, № 48. P. 15834–15841.
53. Zhou Y. et al. NMR solution structure of the integral membrane enzyme DsbB: functional insights into DsbB-catalyzed disulfide bond formation // Mol. Cell. 2008. Vol. 31, № 6. P. 896–908.
54. Liang B., Tamm L.K. Structure of outer membrane protein G by solution NMR spectroscopy // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007. Vol. 104, № 41. P. 16140–16145.
55. Zhang Q. et al. Microscale NMR Screening of New Detergents for Membrane Protein Structural Biology // Journal of the American Chemical Society. 2008. Vol. 130, № 23. P. 7357–7363.
56. Stanczak P. et al. Micro-coil NMR to monitor optimization of the reconstitution conditions for the integral membrane protein OmpW in detergent micelles // J. Biomol. NMR. 2012. Vol. 54, № 2. P. 129–133.
57. Horst R., Stanczak P., Wüthrich K. NMR polypeptide backbone conformation of the E. coli outer membrane protein W // Structure. 2014. Vol. 22, № 8. P. 1204–1209.
58. Marassi F.M. et al. Backbone structure of Yersinia pestis Ail determined in micelles by NMR-restrained simulated annealing with implicit membrane solvation // J. Biomol. NMR. 2015. Vol. 63, № 1. P. 59–65.
59. Maslennikov I. et al. Membrane domain structures of three classes of histidine kinase receptors by cell-free expression and rapid NMR analysis // Proc. Nat. Acad. Sci. 2010. Vol. 107, № 24. P. 10902–10907.
60. Zhuang T., Jap B.K., Sanders C.R. Solution NMR approaches for establishing specificity of weak heterodimerization of membrane proteins // J. Am. Chem. Soc. 2011. Vol. 133, № 50. P. 20571–20580.
61. Barrett P.J. et al. The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol // Science. 2012. Vol. 336, № 6085. P. 1168–1171.
62. Shenkarev Z.O. et al. Lipid-protein nanodiscs as reference medium in detergent screening for high-resolution NMR studies of integral membrane proteins // J. Am. Chem. Soc. 2010. Vol. 132, № 16. P. 5628–5629.
63. Poget S.F., Girvin M.E. Solution NMR of membrane proteins in bilayer mimics: small is beautiful, but sometimes bigger is better // Biochim. Biophys. Acta. 2007. Vol. 1768, № 12. P. 3098–3106.

64. Gautier A. et al. Structure determination of the seven-helix transmembrane receptor sensory rhodopsin II by solution NMR spectroscopy // Nat. Struct. Mol. Biol. 2010. Vol. 17, № 6. P. 768–774.
65. Reckel S. et al. Solution NMR Structure of Proteorhodopsin // Angewandte Chemie International Edition. 2011. Vol. 50, № 50. P. 11942–11946.
66. Butterwick J.A., MacKinnon R. Solution structure and phospholipid interactions of the isolated voltage-sensor domain from KvAP // J. Mol. Biol. 2010. Vol. 403, № 4. P. 591–606.
67. Renault M. et al. Solution state NMR structure and dynamics of KpOmpA, a 210 residue transmembrane domain possessing a high potential for immunological applications // J. Mol. Biol. 2009. Vol. 385, № 1. P. 117–130.
68. Fernández C. et al. NMR structure of the integral membrane protein OmpX // J. Mol. Biol. 2004. Vol. 336, № 5. P. 1211–1221.
69. Edrington T.C. et al. Structural basis for the interaction of lipopolysaccharide with outer membrane protein H (OprH) from Pseudomonas aeruginosa // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286, № 45. P. 39211–39223.
70. Kucharska I. et al. Molecular Interactions of Lipopolysaccharide with an Outer Membrane Protein from Pseudomonas aeruginosa Probed by Solution NMR // Biochemistry. 2016.
71. Bocharov E.V. et al. Structure of FGFR3 transmembrane domain dimer: implications for signaling and human pathologies // Structure. 2013. Vol. 21, № 11. P. 2087–2093.
72. Columbus L. et al. Mixing and matching detergents for membrane protein NMR structure determination // J. Am. Chem. Soc. 2009. Vol. 131, № 21. P. 7320–7326.
73. Eichmann C. et al. Solution NMR structure and functional analysis of the integral membrane protein YgaP from Escherichia coli // J. Biol. Chem. 2014. Vol. 289, № 34. P. 23482–23503.
74. Eichmann C. et al. S-Nitrosylation Induces Structural and Dynamical Changes in a Rhodanese Family Protein // J. Mol. Biol. 2016.
75. Call M.E. et al. The Structure of the ζζ Transmembrane Dimer Reveals Features Essential for Its Assembly with the T Cell Receptor // Cell. 2006. Vol. 127, № 2. P. 355–368.
76. Call M.E., Wucherpfennig K.W., Chou J.J. The structural basis for intramembrane assembly of an activating immunoreceptor complex // Nature Immunology. 2010. Vol. 11, № 11. P. 1023–1029.
77. Mäler L. Solution NMR studies of peptide-lipid interactions in model membranes // Molecular Membrane Biology. 2012. Vol. 29, № 5. P. 155–176.
78. Sanders C.R., Prestegard J.H. Magnetically orientable phospholipid bilayers containing small amounts of a bile salt analogue, CHAPSO // Biophys. J. 1990. Vol. 58, № 2. P. 447–460.
79. Sanders C.R., Schwonek J.P. Characterization of magnetically orientable bilayers in mixtures of dihexanoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylcholine by solid-state NMR // Biochemistry. 1992. Vol. 31, № 37. P. 8898–8905.
80. De Angelis A.A., Opella S.J. Bicelle samples for solid-state NMR of membrane proteins // Nat Protoc. 2007. Vol. 2, № 10. P. 2332–2338.
81. Lenoir M. et al. Structural Basis of Dynamic Membrane Recognition by trans-Golgi Network Specific FAPP Proteins // Journal of Molecular Biology. 2015. Vol. 427, № 4. P. 966–981.
82. Morgado L. et al. Characterization of the insertase BamA in three different membrane mimetics by solution NMR spectroscopy // J. Biomol. NMR. 2015. Vol. 61, № 3–4. P. 333–345.
83. Li M. et al. Morphological characterization of DMPC/CHAPSO bicellar mixtures: a combined SANS and NMR study // Langmuir. 2013. Vol. 29, № 51. P. 15943–15957.
84. van Dam L., Karlsson G., Edwards K. Direct observation and characterization of DMPC/DHPC aggregates under conditions relevant for biological solution NMR // Biochim. Biophys. Acta. 2004. Vol. 1664, № 2. P. 241–256.
85. Yamamoto K. et al. Temperature-Resistant Bicelles for Structural Studies by Solid-State NMR Spectroscopy // Langmuir. 2015. Vol. 31, № 4. P. 1496–1504.

86. Ye W. et al. Characterization of the morphology of fast-tumbling bicelles with varying composition // Langmuir. 2014. Vol. 30, № 19. P. 5488–5496.
87. Lau T.-L. et al. The structure of the integrin alphaIIbbeta3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling // EMBO J. 2009. Vol. 28, № 9. P. 1351–1361.
88. Liu Y., Kahn R.A., Prestegard J.H. Dynamic structure of membrane-anchored Arf*GTP // Nat. Struct. Mol. Biol. 2010. Vol. 17, № 7. P. 876–881.
89. Lee D. et al. Bilayer in small bicelles revealed by lipid-protein interactions using NMR spectroscopy // J. Am. Chem. Soc. 2008. Vol. 130, № 42. P. 13822–13823.
90. Struppe J., Whiles J.A., Vold R.R. Acidic phospholipid bicelles: a versatile model membrane system // Biophys. J. 2000. Vol. 78, № 1. P. 281–289.
91. Marcotte I. et al. Interaction of the neuropeptide met-enkephalin with zwitterionic and negatively charged bicelles as viewed by 31P and 2H solid-state NMR // Biophys. J. 2003. Vol. 85, № 1. P. 328–339.
92. Sasaki H. et al. Cholesterol Doping Induced Enhanced Stability of Bicelles // Langmuir. 2003. Vol. 19, № 23. P. 9841–9844.
93. Barbosa-Barros L. et al. Ceramide effects in the bicelle structure // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2008. Vol. 317, № 1–3. P. 576–584.
94. Gayen A., Mukhopadhyay C. Evidence for effect of GM1 on opioid peptide conformation: NMR study on leucine enkephalin in ganglioside-containing isotropic phospholipid bicelles // Langmuir. 2008. Vol. 24, № 10. P. 5422–5432.
95. Liebau J. et al. Fast-tumbling bicelles constructed from native Escherichia coli lipids // Biochim. Biophys. Acta. 2016. Vol. 1858, № 9. P. 2097–2105.
96. Cavagnero S., Dyson H.J., Wright P.E. Improved low pH bicelle system for orienting macromolecules over a wide temperature range // J. Biomol. NMR. 1999. Vol. 13, № 4. P. 387–391.
97. Matsui R. et al. Chemically Locked Bicelles with High Thermal and Kinetic Stability // Angewandte Chemie International Edition. 2015. Vol. 54, № 45. P. 13284–13288.
98. Glover K.J. et al. Structural evaluation of phospholipid bicelles for solution-state studies of membrane-associated biomolecules // Biophys. J. 2001. Vol. 81, № 4. P. 2163–2171.
99. Triba M.N., Warschawski D.E., Devaux P.F. Reinvestigation by phosphorus NMR of lipid distribution in bicelles // Biophys. J. 2005. Vol. 88, № 3. P. 1887–1901.
100. Arnold A. et al. Cation modulation of bicelle size and magnetic alignment as revealed by solid-state NMR and electron microscopy // Biophys. J. 2002. Vol. 83, № 5. P. 2667–2680.
101. Luchette P.A. et al. Morphology of fast-tumbling bicelles: a small angle neutron scattering and NMR study // Biochim. Biophys. Acta. 2001. Vol. 1513, № 2. P. 83–94.
102. Chou J.J., Baber J.L., Bax A. Characterization of phospholipid mixed micelles by translational diffusion // J. Biomol. NMR. 2004. Vol. 29, № 3. P. 299–308.
103. Björnerås J., Nilsson M., Mäler L. Analysing DHPC/DMPC bicelles by diffusion NMR and multivariate decomposition // Biochim. Biophys. Acta. 2015. Vol. 1848, № 11 Pt A. P. 2910–2917.
104. Lu Z. et al. Bicelles at low concentrations // Mol. Pharm. 2012. Vol. 9, № 4. P. 752–761.
105. Beaugrand M. et al. Lipid concentration and molar ratio boundaries for the use of isotropic bicelles // Langmuir. 2014. Vol. 30, № 21. P. 6162–6170.
106. Schmidt T., Situ A.J., Ulmer T.S. Direct Evaluation of Protein-Lipid Contacts Reveals Protein Membrane Immersion and Isotropic Bicelle Structure // J Phys Chem Lett. 2016. Vol. 7, № 21. P. 4420–4426.
107. Poget S.F., Cahill S.M., Girvin M.E. Isotropic bicelles stabilize the functional form of a small multidrug-resistance pump for NMR structural studies // J. Am. Chem. Soc. 2007. Vol. 129, № 9. P. 2432–2433.

108. Endres N.F. et al. Conformational Coupling across the Plasma Membrane in Activation of the EGF Receptor // Cell. 2013. Vol. 152, № 3. P. 543–556.
109. Zhang M. et al. Effects of membrane mimetics on cytochrome P450-cytochrome b5 interactions characterized by NMR spectroscopy // J. Biol. Chem. 2015. Vol. 290, № 20. P. 12705–12718.
110. Dev J. et al. Structural basis for membrane anchoring of HIV-1 envelope spike // Science. 2016. Vol. 353, № 6295. P. 172–175.
111. Pan L. et al. Higher-Order Clustering of the Transmembrane Anchor of DR5 Drives Signaling // Cell. 2019. Vol. 176, № 6. P. 1477-1489.e14.
112. Fu Q. et al. Structural Basis and Functional Role of Intramembrane Trimerization of the Fas/CD95 Death Receptor // Mol. Cell. 2016. Vol. 61, № 4. P. 602–613.
113. Denisov I.G. et al. Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size // J. Am. Chem. Soc. 2004. Vol. 126, № 11. P. 3477–3487.
114. Midtgaard S.R. et al. Self-assembling peptides form nanodiscs that stabilize membrane proteins // Soft Matter. 2014. Vol. 10, № 5. P. 738–752.
115. Kondo H., Ikeda K., Nakano M. Formation of size-controlled, denaturation-resistant lipid nanodiscs by an amphiphilic self-polymerizing peptide // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2016. Vol. 146. P. 423–430.
116. Denisov I.G. et al. Thermotropic Phase Transition in Soluble Nanoscale Lipid Bilayers // The Journal of Physical Chemistry B. 2005. Vol. 109, № 32. P. 15580–15588.
117. Nakano M. et al. Static and dynamic properties of phospholipid bilayer nanodiscs // J. Am. Chem. Soc. 2009. Vol. 131, № 23. P. 8308–8312.
118. Grinkova Y.V., Denisov I.G., Sligar S.G. Engineering extended membrane scaffold proteins for self-assembly of soluble nanoscale lipid bilayers // Protein Eng. Des. Sel. 2010. Vol. 23, № 11. P. 843–848.
119. Chien C.-T.H. et al. An Adaptable Phospholipid Membrane Mimetic System for Solution NMR Studies of Membrane Proteins // Journal of the American Chemical Society. 2017. Vol. 139, № 42. P. 14829–14832.
120. Kariyazono H. et al. Formation of stable nanodiscs by bihelical apolipoprotein A-I mimetic peptide // J. Pept. Sci. 2016. Vol. 22, № 2. P. 116–122.
121. Carlson M.L. et al. The Peptidisc, a simple method for stabilizing membrane proteins in detergent-free solution // eLife. 2018. Vol. 7.
122. Zhao Z. et al. DNA-Corralled Nanodiscs for the Structural and Functional Characterization of Membrane Proteins and Viral Entry // Journal of the American Chemical Society. 2018. Vol. 140, № 34. P. 10639–10643.
123. Stepien P., Polit A., Wisniewska-Becker A. Comparative EPR studies on lipid bilayer properties in nanodiscs and liposomes // Biochim. Biophys. Acta. 2015. Vol. 1848, № 1 Pt A. P. 60–66.
124. Mörs K. et al. Modified lipid and protein dynamics in nanodiscs // Biochim. Biophys. Acta. 2013. Vol. 1828, № 4. P. 1222–1229.
125. Dörr J.M. et al. Detergent-free isolation, characterization, and functional reconstitution of a tetrameric K+ channel: the power of native nanodiscs // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2014. Vol. 111, № 52. P. 18607–18612.
126. Denisov I.G., Sligar S.G. Nanodiscs in Membrane Biochemistry and Biophysics // Chemical Reviews. 2017. Vol. 117, № 6. P. 4669–4713.
127. Lyukmanova E.N. et al. Lipid-protein nanoscale bilayers: a versatile medium for NMR investigations of membrane proteins and membrane-active peptides // J. Am. Chem. Soc. 2008. Vol. 130, № 7. P. 2140–2141.
128. Shenkarev Z.O. et al. Peptaibol antiamoebin I: spatial structure, backbone dynamics, interaction with bicelles and lipid-protein nanodiscs, and pore formation in context of barrel-stave model // Chem. Biodivers. 2013. Vol. 10, № 5. P. 838–863.

129. Shenkarev Z.O. et al. Lipid-protein nanodiscs offer new perspectives for structural and functional studies of water-soluble membrane-active peptides // Acta Naturae. 2014. Vol. 6, № 2. P. 84–94.
130. Tzitzilonis C. et al. Detergent/nanodisc screening for high-resolution NMR studies of an integral membrane protein containing a cytoplasmic domain // PLoS ONE. 2013. Vol. 8, № 1. P. e54378.
131. Kucharska I. et al. Optimizing nanodiscs and bicelles for solution NMR studies of two β-barrel membrane proteins // Journal of Biomolecular NMR. 2015. Vol. 61, № 3–4. P. 261–274.
132. Yu T.-Y. et al. Solution NMR spectroscopic characterization of human VDAC-2 in detergent micelles and lipid bilayer nanodiscs // Biochim. Biophys. Acta. 2012. Vol. 1818, № 6. P. 1562–1569.
133. Raschle T. et al. Structural and functional characterization of the integral membrane protein VDAC-1 in lipid bilayer nanodiscs // J. Am. Chem. Soc. 2009. Vol. 131, № 49. P. 17777–17779.
134. Glück J.M. et al. Integral membrane proteins in nanodiscs can be studied by solution NMR spectroscopy // J. Am. Chem. Soc. 2009. Vol. 131, № 34. P. 12060–12061.
135. Hagn F., Wagner G. Structure refinement and membrane positioning of selectively labeled OmpX in phospholipid nanodiscs // J Biomol NMR. 2014. P. 1–12.
136. Fox D.A. et al. Structure of the Neisserial outer membrane protein Opa60: loop flexibility essential to receptor recognition and bacterial engulfment // J. Am. Chem. Soc. 2014. Vol. 136, № 28. P. 9938–9946.
137. Bibow S. et al. Solution structure of discoidal high-density lipoprotein particles with a shortened apolipoprotein A-I // Nat. Struct. Mol. Biol. 2017. Vol. 24, № 2. P. 187–193.
138. Martinez D. et al. Lipid Internal Dynamics Probed in Nanodiscs // Chemphyschem. 2017. Vol. 18, № 19. P. 2651–2657.
139. Bibow S., Hiller S. A guide to quantifying membrane protein dynamics in lipids and other native-like environments by solution-state NMR spectroscopy // FEBS J. 2019. Vol. 286, № 9. P. 1610–1623.
140. Qasim A. et al. Investigation of a KcsA Cytoplasmic pH Gate in Lipoprotein Nanodiscs // ChemBioChem. 2019. Vol. 20, № 6. P. 813–821.
141. Efremov R.G. et al. Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor // Nature. 2015. Vol. 517, № 7532. P. 39–43.
142. Gao Y. et al. TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action // Nature. 2016. Vol. 534, № 7607. P. 347–351.
143. Kumar R.B. et al. Structural and Functional Analysis of Calcium Ion Mediated Binding of 5-Lipoxygenase to Nanodiscs // PLoS ONE. 2016. Vol. 11, № 3. P. e0152116.
144. Daury L. et al. Tripartite assembly of RND multidrug efflux pumps // Nat Commun. 2016. Vol. 7. P. 10731.
145. Matthies D. et al. Cryo-EM Structures of the Magnesium Channel CorA Reveal Symmetry Break upon Gating // Cell. 2016. Vol. 164, № 4. P. 747–756.
146. Zhang P. et al. An Isoform-Specific Myristylation Switch Targets Type II PKA Holoenzymes to Membranes // Structure. 2015. Vol. 23, № 9. P. 1563–1572.
147. Sadler E.E., Kapanidis A.N., Tucker S.J. Solution-Based Single-Molecule FRET Studies of K(+) Channel Gating in a Lipid Bilayer // Biophys. J. 2016. Vol. 110, № 12. P. 2663–2670.
148. Karlova M.G. et al. Detergent-free solubilization of human Kv channels expressed in mammalian cells // Chem. Phys. Lipids. 2019. Vol. 219. P. 50–57.
149. Knowles T.J. et al. Membrane Proteins Solubilized Intact in Lipid Containing Nanoparticles Bounded by Styrene Maleic Acid Copolymer // Journal of the American Chemical Society. 2009. Vol. 131, № 22. P. 7484–7485.
150. Orwick-Rydmark M. et al. Detergent-free incorporation of a seven-transmembrane receptor protein into nanosized bilayer Lipodisq particles for functional and biophysical studies // Nano Lett. 2012. Vol. 12, № 9. P. 4687–4692.

151. Craig A.F. et al. Tuning the size of styrene-maleic acid copolymer-lipid nanoparticles (SMALPs) using RAFT polymerization for biophysical studies // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2016.
152. Domínguez Pardo J.J. et al. Membrane Solubilization by Styrene-Maleic Acid Copolymers: Delineating the Role of Polymer Length // Biophysical Journal. 2018. Vol. 115, № 1. P. 129–138.
153. Dominguez Pardo J.J. et al. Thermotropic properties of phosphatidylcholine nanodiscs bounded by styrene-maleic acid copolymers // Chemistry and Physics of Lipids. 2017. Vol. 208. P. 58–64.
154. Ravula T. et al. Effect of polymer charge on functional reconstitution of membrane proteins in polymer nanodiscs // Chemical Communications. 2018. Vol. 54, № 69. P. 9615–9618.
155. Oluwole A.O. et al. Formation of Lipid-Bilayer Nanodiscs by Diisobutylene/Maleic Acid (DIBMA) Copolymer // Langmuir. 2017. Vol. 33, № 50. P. 14378–14388.
156. Ravula T. et al. Styrene maleic acid derivates to enhance the applications of bio-inspired polymer based lipid-nanodiscs // European Polymer Journal. 2018. Vol. 108. P. 597–602.
157. Zhang R. et al. Characterizing the structure of lipodisq nanoparticles for membrane protein spectroscopic studies // Biochim. Biophys. Acta. 2015. Vol. 1848, № 1 Pt B. P. 329–333.
158. Bada Juarez J.F. et al. From polymer chemistry to structural biology: The development of SMA and related amphipathic polymers for membrane protein extraction and solubilisation // Chemistry and Physics of Lipids. 2019. Vol. 221. P. 167–175.
159. Gohon Y. et al. Bacteriorhodopsin/amphipol complexes: structural and functional properties // Biophys. J. 2008. Vol. 94, № 9. P. 3523–3537.
160. Popot J.-L. et al. Amphipols from A to Z // Annu Rev Biophys. 2011. Vol. 40. P. 379–408.
161. Planchard N. et al. The Use of Amphipols for Solution NMR Studies of Membrane Proteins: Advantages and Constraints as Compared to Other Solubilizing Media // The Journal of Membrane Biology. 2014. Vol. 247, № 9–10. P. 827–842.
162. Zoonens M. et al. NMR study of a membrane protein in detergent-free aqueous solution // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2005. Vol. 102, № 25. P. 8893–8898.
163. Catoire L.J. et al. Inter- and intramolecular contacts in a membrane protein/surfactant complex observed by heteronuclear dipole-to-dipole cross-relaxation // J. Magn. Reson. 2009. Vol. 197, № 1. P. 91–95.
164. Catoire L.J. et al. Structure of a GPCR ligand in its receptor-bound state: leukotriene B4 adopts a highly constrained conformation when associated to human BLT2 // J. Am. Chem. Soc. 2010. Vol. 132, № 26. P. 9049–9057.
165. Catoire L.J. et al. Solution NMR mapping of water-accessible residues in the transmembrane beta-barrel of OmpX // Eur. Biophys. J. 2010. Vol. 39, № 4. P. 623–630.
166. Etzkorn M. et al. How amphipols embed membrane proteins: global solvent accessibility and interaction with a flexible protein terminus // J. Membr. Biol. 2014. Vol. 247, № 9–10. P. 965–970.
167. Dahmane T. et al. Sulfonated amphipols: synthesis, properties, and applications // Biopolymers. 2011. Vol. 95, № 12. P. 811–823.
168. Bazzacco P. et al. Nonionic Homopolymeric Amphipols: Application to Membrane Protein Folding, Cell-Free Synthesis, and Solution Nuclear Magnetic Resonance // Biochemistry. 2012. Vol. 51, № 7. P. 1416–1430.
169. Feinstein H.E. et al. Long-term stability of a vaccine formulated with the amphipol-trapped major outer membrane protein from Chlamydia trachomatis // J. Membr. Biol. 2014. Vol. 247, № 9–10. P. 1053–1065.
170. Bayburt T.H., Sligar S.G. Membrane protein assembly into Nanodiscs // FEBS Lett. 2010. Vol. 584, № 9. P. 1721–1727.
171. Tribet C., Audebert R., Popot J.L. Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1996. Vol. 93, № 26. P. 15047–15050.

172. Zhang Q. et al. Designing facial amphiphiles for the stabilization of integral membrane proteins // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2007. Vol. 46, № 37. P. 7023–7025.
173. Focke P.J. et al. Combining in Vitro Folding with Cell Free Protein Synthesis for Membrane Protein Expression // Biochemistry. 2016. Vol. 55, № 30. P. 4212–4219.
174. Roos C. et al. High-level cell-free production of membrane proteins with nanodiscs // Methods Mol. Biol. 2014. Vol. 1118. P. 109–130.
175. Sušac L. et al. A2A adenosine receptor functional states characterized by 19F-NMR // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2018. Vol. 115, № 50. P. 12733–12738.
176. Thiagarajan-Rosenkranz P. et al. A Positively Charged Liquid Crystalline Medium for Measuring Residual Dipolar Couplings in Membrane Proteins by NMR // J. Am. Chem. Soc. 2015. Vol. 137, № 37. P. 11932–11934.
177. Warner L.R. et al. Structure of the BamC two-domain protein obtained by Rosetta with a limited NMR data set // J. Mol. Biol. 2011. Vol. 411, № 1. P. 83–95.
178. Stanczak P. et al. NMR characterization of membrane protein-detergent micelle solutions by use of microcoil equipment // J. Am. Chem. Soc. 2009. Vol. 131, № 51. P. 18450–18456.
179. Singer S.J., Nicolson G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes // Science. 1972. Vol. 175, № 4023. P. 720–731.
180. Ruysschaert J.-M., Lonez C. Role of lipid microdomains in TLR-mediated signalling // Biochim. Biophys. Acta. 2015. Vol. 1848, № 9. P. 1860–1867.
181. Risselada H.J., Marrink S.J. The molecular face of lipid rafts in model membranes // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2008. Vol. 105, № 45. P. 17367–17372.
182. Hedger G., Sansom M.S.P. Lipid interaction sites on channels, transporters and receptors: Recent insights from molecular dynamics simulations // Biochim. Biophys. Acta. 2016.
183. Hedger G., Sansom M.S.P., Koldsø H. The juxtamembrane regions of human receptor tyrosine kinases exhibit conserved interaction sites with anionic lipids // Sci Rep. 2015. Vol. 5. P. 9198.
184. Saotome K., Duong-Ly K.C., Howard K.P. Influenza A M2 protein conformation depends on choice of model membrane: Conformation of M2 Protein in Lipid Bilayers // Biopolymers. 2015. Vol. 104, № 4. P. 405–411.
185. Chou J.J. et al. Micelle-induced curvature in a water-insoluble HIV-1 Env peptide revealed by NMR dipolar coupling measurement in stretched polyacrylamide gel // J. Am. Chem. Soc. 2002. Vol. 124, № 11. P. 2450–2451.
186. Vogt J., Schulz G.E. The structure of the outer membrane protein OmpX from Escherichia coli reveals possible mechanisms of virulence // Structure. 1999. Vol. 7, № 10. P. 1301–1309.
187. Li D. et al. Crystal structure of the integral membrane diacylglycerol kinase // Nature. 2013. Vol. 497, № 7450. P. 521–524.
188. Chen Y. et al. Conformation and topology of diacylglycerol kinase in E.coli membranes revealed by solid-state NMR spectroscopy // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2014. Vol. 53, № 22. P. 5624–5628.
189. Kay L.E., Gardner K.H. Solution NMR spectroscopy beyond 25 kDa // Current Opinion in Structural Biology. 1997. Vol. 7, № 5. P. 722–731.
190. Religa T.L., Sprangers R., Kay L.E. Dynamic Regulation of Archaeal Proteasome Gate Opening As Studied by TROSY NMR // Science. 2010. Vol. 328, № 5974. P. 98–102.
191. Huang R., Pérez F., Kay L.E. Probing the cooperativity of Thermoplasma acidophilum proteasome core particle gating by NMR spectroscopy // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2017. Vol. 114, № 46. P. E9846–E9854.
192. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual: Vol. 2. 2. ed. S.l.: Cold Spring Harbor, 1989.
193. Marley J., Lu M., Bracken C. A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins // J. Biomol. NMR. 2001. Vol. 20, № 1. P. 71–75.

194. Ross A. et al. Optimised fermentation strategy for 13C/15N recombinant protein labelling in Escherichia coli for NMR-structure analysis // J. Biotechnol. 2004. Vol. 108, № 1. P. 31–39.
195. Markley J.L., Putter I., Jardetzky O. High-resolution nuclear magnetic resonance spectra of selectively deuterated staphylococcal nuclease // Science. 1968. Vol. 161, № 3847. P. 1249–1251.
196. Cai M. et al. An efficient and cost-effective isotope labeling protocol for proteins expressed in Escherichia coli // J. Biomol. NMR. 1998. Vol. 11, № 1. P. 97–102.
197. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures // Protein Expr. Purif. 2005. Vol. 41, № 1. P. 207–234.
198. Kosobokova E.N., Skrypnik K.A., Kosorukov V.S. Overview of Fusion Tags for Recombinant Proteins // Biochemistry Mosc. 2016. Vol. 81, № 3. P. 187–200.
199. Lyukmanova E.N. et al. N-Terminal Fusion Tags for Effective Production of G-Protein-Coupled Receptors in Bacterial Cell-Free Systems // Acta Naturae. 2012. Vol. 4, № 4. P. 58–64.
200. Sugiki T. et al. Isotopic labeling of heterologous proteins in the yeast Pichia pastoris and Kluyveromyces lactis // Methods Mol. Biol. 2012. Vol. 831. P. 19–36.
201. Colussi P.A., Taron C.H. Kluyveromyces lactis LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in K. lactis // Appl. Environ. Microbiol. 2005. Vol. 71, № 11. P. 7092–7098.
202. Read J.D. et al. Acetamide selection of Kluyveromyces lactis cells transformed with an integrative vector leads to high-frequency formation of multicopy strains // Appl. Environ. Microbiol. 2007. Vol. 73, № 16. P. 5088–5096.
203. Sugiki T., Shimada I., Takahashi H. Stable isotope labeling of protein by Kluyveromyces lactis for NMR study // J. Biomol. NMR. 2008. Vol. 42, № 3. P. 159–162.
204. Franke B. et al. Production of isotope-labeled proteins in insect cells for NMR // Journal of Biomolecular NMR. 2018. Vol. 71, № 3. P. 173–184.
205. Opitz C., Isogai S., Grzesiek S. An economic approach to efficient isotope labeling in insect cells using homemade 15N-, 13C- and 2H-labeled yeast extracts // Journal of Biomolecular NMR. 2015. Vol. 62, № 3. P. 373–385.
206. Sitarska A. et al. Affordable uniform isotope labeling with 2H, 13C and 15N in insect cells // Journal of Biomolecular NMR. 2015. Vol. 62, № 2. P. 191–197.
207. Yanaka S. et al. Stable isotope labeling approaches for NMR characterization of glycoproteins using eukaryotic expression systems // Journal of Biomolecular NMR. 2018. Vol. 71, № 3. P. 193–202.
208. Yagi H. et al. Stable isotope labeling of glycoprotein expressed in silkworms using immunoglobulin G as a test molecule // Journal of Biomolecular NMR. 2015. Vol. 62, № 2. P. 157–167.
209. Harrison R.L., Jarvis D.L. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce “mammalianized” recombinant glycoproteins // Adv. Virus Res. 2006. Vol. 68. P. 159–191.
210. Yamaguchi Y., Kato K. Dynamics and interactions of glycoconjugates probed by stable-isotope-assisted NMR spectroscopy // Meth. Enzymol. 2010. Vol. 478. P. 305–322.
211. Kato K., Yamaguchi Y., Arata Y. Stable-isotope-assisted NMR approaches to glycoproteins using immunoglobulin G as a model system // Prog Nucl Magn Reson Spectrosc. 2010. Vol. 56, № 4. P. 346–359.
212. Kato K., Yanaka S., Yagi H. Technical Basis for Nuclear Magnetic Resonance Approach for Glycoproteins // Experimental Approaches of NMR Spectroscopy / ed. The Nuclear Magnetic Resonance Soci. Singapore: Springer Singapore, 2018. P. 415–438.
213. Kunert R., Reinhart D. Advances in recombinant antibody manufacturing // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. Vol. 100, № 8. P. 3451–3461.
214. Omasa T., Onitsuka M., Kim W.-D. Cell engineering and cultivation of chinese hamster ovary (CHO) cells // Curr Pharm Biotechnol. 2010. Vol. 11, № 3. P. 233–240.

215. Ozawa K. et al. Cell-free protein synthesis in an autoinduction system for NMR studies of protein-protein interactions // J. Biomol. NMR. 2005. Vol. 32, № 3. P. 235–241.
216. Shin J., Noireaux V. Study of messenger RNA inactivation and protein degradation in an Escherichia coli cell-free expression system // J Biol Eng. 2010. Vol. 4. P. 9.
217. Spirin A.S. et al. A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield // Science. 1988. Vol. 242, № 4882. P. 1162–1164.
218. Schwarz D. et al. Preparative scale expression of membrane proteins in Escherichia coli-based continuous exchange cell-free systems // Nat Protoc. 2007. Vol. 2, № 11. P. 2945–2957.
219. Harbers M. Wheat germ systems for cell-free protein expression // FEBS Lett. 2014. Vol. 588, № 17. P. 2762–2773.
220. Spirin A.S. High-throughput cell-free systems for synthesis of functionally active proteins // Trends Biotechnol. 2004. Vol. 22, № 10. P. 538–545.
221. Carlson E.D. et al. Cell-free protein synthesis: applications come of age // Biotechnol. Adv. 2012. Vol. 30, № 5. P. 1185–1194.
222. Zemella A. et al. Cell-Free Protein Synthesis: Pros and Cons of Prokaryotic and Eukaryotic Systems // Chembiochem. 2015. Vol. 16, № 17. P. 2420–2431.
223. Katzen F., Chang G., Kudlicki W. The past, present and future of cell-free protein synthesis // Trends Biotechnol. 2005. Vol. 23, № 3. P. 150–156.
224. Reckel S. et al. Strategies for the cell-free expression of membrane proteins // Methods Mol. Biol. 2010. Vol. 607. P. 187–212.
225. Hein C. et al. Hydrophobic supplements in cell-free systems: Designing artificial environments for membrane proteins // Engineering in Life Sciences. 2014. Vol. 14, № 4. P. 365–379.
226. Cavanagh J. Protein NMR spectroscopy : principles and practice. 2nd ed. Amsterdam ;;Boston: Academic Press, 2007.
227. Düx P. et al. Measurement of (15)N- (1)H coupling constants in uniformly (15)N-labeled proteins: Application to the photoactive yellow protein // J. Biomol. NMR. 1997. Vol. 10, № 3. P. 301–306.
228. Vuister G.W., Bax A. Quantitative J correlation: a new approach for measuring homonuclear three-bond J(HNH.alpha.) coupling constants in 15N-enriched proteins // J. Am. Chem. Soc. 1993. Vol. 115, № 17. P. 7772–7777.
229. Vuister G.W., Wang A.C., Bax A. Measurement of three-bond nitrogen-carbon J couplings in proteins uniformly enriched in nitrogen-15 and carbon-13 // Journal of the American Chemical Society. 1993. Vol. 115, № 12. P. 5334–5335.
230. Grzesiek S., Vuister G.W., Bax A. A simple and sensitive experiment for measurement of JCC couplings between backbone carbonyl and methyl carbons in isotopically enriched proteins // Journal of biomolecular NMR. 1993. Vol. 3, № 4. P. 487–493.
231. Grzesiek S. et al. Carbon-13 line narrowing by deuterium decoupling in deuterium/carbon-13/nitrogen-15 enriched proteins. Application to triple resonance 4D J connectivity of sequential amides // J. Am. Chem. Soc. 1993. Vol. 115, № 10. P. 4369–4370.
232. Oxenoid K. et al. NMR assignments for a helical 40 kDa membrane protein // J. Am. Chem. Soc. 2004. Vol. 126, № 16. P. 5048–5049.
233. Fiaux J. et al. Uniform and residue-specific 15N-labeling of proteins on a highly deuterated background // J. Biomol. NMR. 2004. Vol. 29, № 3. P. 289–297.
234. Katz J.J., Crespi H.L. Deuterated organisms: cultivation and uses // Science. 1966. Vol. 151, № 3715. P. 1187–1194.
235. Takeuchi K., Sun Z.-Y.J., Wagner G. Alternate ^{13}C− ^{12}C Labeling for Complete Mainchain Resonance Assignments using Cα Direct-Detection with Applicability Toward Fast Relaxing Protein Systems // Journal of the American Chemical Society. 2008. Vol. 130, № 51. P. 17210–17211.

236. Muchmore D.C. et al. Expression and nitrogen-15 labeling of proteins for proton and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance // Meth. Enzymol. 1989. Vol. 177. P. 44–73.
237. Waugh D.S. Genetic tools for selective labeling of proteins with alpha-15N-amino acids // J. Biomol. NMR. 1996. Vol. 8, № 2. P. 184–192.
238. Lin M.T. et al. A rapid and robust method for selective isotope labeling of proteins // Methods. 2011. Vol. 55, № 4. P. 370–378.
239. Vance C.K., Kang Y.M., Miller A.F. Selective 15N labeling and direct observation by NMR of the active-site glutamine of Fe-containing superoxide dismutase // J. Biomol. NMR. 1997. Vol. 9, № 2. P. 201–206.
240. Hein C. et al. Acceleration of protein backbone NMR assignment by combinatorial labeling: Application to a small molecule binding study: HEIN et al. // Biopolymers. 2017. Vol. 107, № 5. P. e23013.
241. Myshkin M.Yu. et al. CombLabel: rational design of optimized sequence-specific combinatorial labeling schemes. Application to backbone assignment of membrane proteins with low stability // J Biomol NMR. 2019.
242. Sobhanifar S. et al. Cell-free expression and stable isotope labelling strategies for membrane proteins // J. Biomol. NMR. 2010. Vol. 46, № 1. P. 33–43.
243. Jones D.H. et al. Site-specific labeling of proteins with NMR-active unnatural amino acids // J. Biomol. NMR. 2010. Vol. 46, № 1. P. 89–100.
244. Cellitti S.E. et al. In vivo incorporation of unnatural amino acids to probe structure, dynamics, and ligand binding in a large protein by nuclear magnetic resonance spectroscopy // J. Am. Chem. Soc. 2008. Vol. 130, № 29. P. 9268–9281.
245. Xie J., Schultz P.G. An expanding genetic code // Methods. 2005. Vol. 36, № 3. P. 227–238.
246. Manglik A. et al. Structural Insights into the Dynamic Process of β2-Adrenergic Receptor Signaling // Cell. 2015. Vol. 161, № 5. P. 1101–1111.
247. Gardner K.H., Kay L.E. Production and Incorporation of 15N, 13C, 2H (1H-δ1 Methyl) Isoleucine into Proteins for Multidimensional NMR Studies // J. Am. Chem. Soc. 1997. Vol. 119, № 32. P. 7599–7600.
248. Goto N.K. et al. A robust and cost-effective method for the production of Val, Leu, Ile (δ1) methyl-protonated 15N-, 13C-, 2H-labeled proteins // J Biomol NMR. 1999. Vol. 13, № 4. P. 369–374.
249. Isaacson R.L. et al. A New Labeling Method for Methyl Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy NMR Spectra of Alanine Residues // Journal of the American Chemical Society. 2007. Vol. 129, № 50. P. 15428–15429.
250. Fischer M. et al. Synthesis of a13C-Methyl-Group-Labeled Methionine Precursor as a Useful Tool for Simplifying Protein Structural Analysis by NMR Spectroscopy // ChemBioChem. 2007. Vol. 8, № 6. P. 610–612.
251. Gelis I. et al. Structural Basis for Signal-Sequence Recognition by the Translocase Motor SecA as Determined by NMR // Cell. 2007. Vol. 131, № 4. P. 756–769.
252. Ayala I. et al. An efficient protocol for the complete incorporation of methyl-protonated alanine in perdeuterated protein // Journal of Biomolecular NMR. 2009. Vol. 43, № 2. P. 111–119.
253. Stoffregen M.C. et al. Methionine Scanning as an NMR Tool for Detecting and Analyzing Biomolecular Interaction Surfaces // Structure. 2012. Vol. 20, № 4. P. 573–581.
254. Velyvis A., Ruschak A.M., Kay L.E. An Economical Method for Production of 2H,13CH3-Threonine for Solution NMR Studies of Large Protein Complexes: Application to the 670 kDa Proteasome // PLoS ONE / ed. Campos-Olivas R. 2012. Vol. 7, № 9. P. e43725.
255. Proudfoot A. et al. Facilitating unambiguous NMR assignments and enabling higher probe density through selective labeling of all methyl containing amino acids // Journal of Biomolecular NMR. 2016. Vol. 65, № 1. P. 15–27.

256. Miyanoiri Y. et al. Highly efficient residue-selective labeling with isotope-labeled Ile, Leu, and Val using a new auxotrophic E. coli strain // Journal of Biomolecular NMR. 2016. Vol. 65, № 2. P. 109–119.
257. Clark L. et al. Methyl labeling and TROSY NMR spectroscopy of proteins expressed in the eukaryote Pichia pastoris // Journal of Biomolecular NMR. 2015. Vol. 62, № 3. P. 239–245.
258. Kofuku Y. et al. Deuteration and selective labeling of alanine methyl groups of β2-adrenergic receptor expressed in a baculovirus-insect cell expression system // Journal of Biomolecular NMR. 2018. Vol. 71, № 3. P. 185–192.
259. Linser R. et al. Selective methyl labeling of eukaryotic membrane proteins using cell-free expression // J. Am. Chem. Soc. 2014. Vol. 136, № 32. P. 11308–11310.
260. Lazarova M. et al. Precursor-Based Selective Methyl Labeling of Cell-Free Synthesized Proteins // ACS Chemical Biology. 2018. Vol. 13, № 8. P. 2170–2178.
261. Schörghuber J. et al. Late metabolic precursors for selective aromatic residue labeling // J. Biomol. NMR. 2018. Vol. 71, № 3. P. 129–140.
262. Weininger U. Optimal Isotope Labeling of Aromatic Amino Acid Side Chains for NMR Studies of Protein Dynamics // Meth. Enzymol. 2019. Vol. 614. P. 67–86.
263. Tugarinov V., Kay L.E. Ile, Leu, and Val methyl assignments of the 723-residue malate synthase G using a new labeling strategy and novel NMR methods // J. Am. Chem. Soc. 2003. Vol. 125, № 45. P. 13868–13878.
264. Kainosho M. et al. Optimal isotope labelling for NMR protein structure determinations // Nature. 2006. Vol. 440, № 7080. P. 52–57.
265. Kainosho M., Güntert P. SAIL – stereo-array isotope labeling // Q. Rev. Biophys. 2009. Vol. 42, № 04. P. 247–300.
266. Kainosho M. et al. Perspective: next generation isotope-aided methods for protein NMR spectroscopy // J Biomol NMR. 2018. P. 1–9.
267. Takeda M. et al. Application of SAIL phenylalanine and tyrosine with alternative isotope-labeling patterns for protein structure determination // J. Biomol. NMR. 2010. Vol. 46, № 1. P. 45–49.
268. Löhr F. et al. Combinatorial triple-selective labeling as a tool to assist membrane protein backbone resonance assignment // Journal of Biomolecular NMR. 2012. Vol. 52, № 3. P. 197–210.
269. Löhr F. et al. An extended combinatorial 15N, 13Cα, and ^{13} {\text{C}}^{\prime } labeling approach to protein backbone resonance assignment // J Biomol NMR. 2015. Vol. 62, № 3. P. 263–279.
270. Li H., Frieden C. Fluorine-19 NMR Studies on the Acid State of the Intestinal Fatty Acid Binding Protein // Biochemistry. 2006. Vol. 45, № 20. P. 6272–6278.
271. Campos-Olivas R. et al. Placement of 19F into the center of GB1: effects on structure and stability // FEBS Lett. 2002. Vol. 517, № 1–3. P. 55–60.
272. Evanics F. et al. Tryptophan solvent exposure in folded and unfolded states of an SH3 domain by 19F and 1H NMR // Biochemistry. 2006. Vol. 45, № 47. P. 14120–14128.
273. Prosser R.S. et al. Current applications of bicelles in NMR studies of membrane-associated amphiphiles and proteins // Biochemistry. 2006. Vol. 45, № 28. P. 8453–8465.
274. Xiao G. et al. Conformational changes in the crystal structure of rat glutathione transferase M1-1 with global substitution of 3-fluorotyrosine for tyrosine // J. Mol. Biol. 1998. Vol. 281, № 2. P. 323–339.
275. Kim H.W. et al. The specific incorporation of labelled aromatic amino acids into proteins through growth of bacteria in the presence of glyphosate. Application to fluorotryptophan labelling to the H(+)-ATPase of Escherichia coli and NMR studies // FEBS Lett. 1990. Vol. 272, № 1–2. P. 34–36.
276. Furter R. Expansion of the genetic code: site-directed p-fluoro-phenylalanine incorporation in Escherichia coli // Protein Sci. 1998. Vol. 7, № 2. P. 419–426.

277. Luchette P.A., Prosser R.S., Sanders C.R. Oxygen as a Paramagnetic Probe of Membrane Protein Structure by Cysteine Mutagenesis and 19F NMR Spectroscopy // J. Am. Chem. Soc. 2002. Vol. 124, № 8. P. 1778–1781.
278. Adriaensens P. et al. Investigation of protein structure by means of 19F-NMR. A study of hen egg-white lysozyme // Eur. J. Biochem. 1988. Vol. 177, № 2. P. 383–394.
279. Gerig J.T. Fluorine NMR of proteins // Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. 1994. Vol. 26. P. 293–370.
280. Kim H.J. et al. Recent Advances in the Application of Solution NMR Spectroscopy to Multi-Span Integral Membrane Proteins // Prog Nucl Magn Reson Spectrosc. 2009. Vol. 55, № 4. P. 335–360.
281. Oxenoid K., Sönnichsen F.D., Sanders C.R. Topology and secondary structure of the N-terminal domain of diacylglycerol kinase // Biochemistry. 2002. Vol. 41, № 42. P. 12876–12882.
282. Loewen M.C. et al. Solution 19F nuclear Overhauser effects in structural studies of the cytoplasmic domain of mammalian rhodopsin // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2001. Vol. 98, № 9. P. 4888–4892.
283. Kitevski-LeBlanc J.L., Prosser R.S. Current applications of 19F NMR to studies of protein structure and dynamics // Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. 2012. Vol. 62. P. 1–33.
284. Kalbitzer H.R. et al. A new high sensitivity 19F probe for labeling cysteine groups of proteins // NMR Biomed. 1992. Vol. 5, № 6. P. 347–350.
285. Dawson P.E. et al. Synthesis of proteins by native chemical ligation // Science. 1994. Vol. 266, № 5186. P. 776–779.
286. Yamazaki T. et al. Segmental Isotope Labeling for Protein NMR Using Peptide Splicing // J. Am. Chem. Soc. 1998. Vol. 120, № 22. P. 5591–5592.
287. Mao H. et al. Sortase-mediated protein ligation: a new method for protein engineering // J. Am. Chem. Soc. 2004. Vol. 126, № 9. P. 2670–2671.
288. Mikula K.M. et al. Segmental isotopic labeling by asparaginyl endopeptidase-mediated protein ligation // Journal of Biomolecular NMR. 2018. Vol. 71, № 4. P. 225–235.
289. Xu M.Q., Perler F.B. The mechanism of protein splicing and its modulation by mutation // EMBO J. 1996. Vol. 15, № 19. P. 5146–5153.
290. Skrisovska L., Schubert M., Allain F.H.-T. Recent advances in segmental isotope labeling of proteins: NMR applications to large proteins and glycoproteins // Journal of Biomolecular NMR. 2010. Vol. 46, № 1. P. 51–65.
291. Volkmann G., Iwaï H. Protein trans-splicing and its use in structural biology: opportunities and limitations // Molecular BioSystems. 2010. Vol. 6, № 11. P. 2110.
292. Xu R. et al. Chemical ligation of folded recombinant proteins: segmental isotopic labeling of domains for NMR studies // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999. Vol. 96, № 2. P. 388–393.
293. Shiraishi Y. et al. Phosphorylation-induced conformation of β2-adrenoceptor related to arrestin recruitment revealed by NMR // Nature Communications. 2018. Vol. 9, № 1.
294. Antos J.M., Truttmann M.C., Ploegh H.L. Recent advances in sortase-catalyzed ligation methodology // Curr. Opin. Struct. Biol. 2016. Vol. 38. P. 111–118.
295. Mikula K.M. et al. Segmental isotopic labeling of a single-domain globular protein without any refolding step by an asparaginyl endopeptidase // FEBS Lett. 2017. Vol. 591, № 9. P. 1285–1294.
296. Harris K.S. et al. Efficient backbone cyclization of linear peptides by a recombinant asparaginyl endopeptidase // Nat Commun. 2015. Vol. 6. P. 10199.
297. Pervushin K. et al. Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997. Vol. 94, № 23. P. 12366–12371.
298. Tugarinov V. et al. Cross-correlated relaxation enhanced 1H[bond]13C NMR spectroscopy of methyl groups in very high molecular weight proteins and protein complexes // J. Am. Chem. Soc. 2003. Vol. 125, № 34. P. 10420–10428.

299. Chill J.H. et al. Measurement of 15N relaxation in the detergent-solubilized tetrameric KcsA potassium channel // J. Biomol. NMR. 2006. Vol. 36, № 2. P. 123–136.
300. Pervushin K. et al. Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy (TROSY) for NMR Studies of Aromatic Spin Systems in 13C-Labeled Proteins // J. Am. Chem. Soc. 1998. Vol. 120, № 25. P. 6394–6400.
301. Meissner A., Sorensen O.W. Optimization of three-dimensional TROSY-type HCCH NMR correlation of aromatic (1)H-(13)C groups in proteins // J. Magn. Reson. 1999. Vol. 139, № 2. P. 447–450.
302. Ollerenshaw J.E., Tugarinov V., Kay L.E. Methyl TROSY: explanation and experimental verification // Magnetic Resonance in Chemistry. 2003. Vol. 41, № 10. P. 843–852.
303. Tugarinov V., Sprangers R., Kay L.E. Line narrowing in methyl-TROSY using zero-quantum 1H-13C NMR spectroscopy // J. Am. Chem. Soc. 2004. Vol. 126, № 15. P. 4921–4925.
304. Felli I.C., Pierattelli R. Novel methods based on (13)C detection to study intrinsically disordered proteins // J. Magn. Reson. 2014. Vol. 241. P. 115–125.
305. Takeuchi K. et al. Nitrogen detected TROSY at high field yields high resolution and sensitivity for protein NMR // Journal of Biomolecular NMR. 2015. Vol. 63, № 4. P. 323–331.
306. Takeuchi K. et al. Nitrogen-detected TROSY yields comparable sensitivity to proton-detected TROSY for non-deuterated, large proteins under physiological salt conditions // Journal of Biomolecular NMR. 2016. Vol. 64, № 2. P. 143–151.
307. Freilich R. et al. Competing protein-protein interactions regulate binding of Hsp27 to its client protein tau // Nat Commun. 2018. Vol. 9, № 1. P. 4563.
308. Morris G.A., Freeman R. Enhancement of nuclear magnetic resonance signals by polarization transfer // Journal of the American Chemical Society. 1979. Vol. 101, № 3. P. 760–762.
309. Kimmich R. Cross-Polarization Principles // NMR: Tomography, Diffusometry, Relaxometry / ed. Kimmich R. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1997. P. 360–366.
310. Dalvit C. 1H to 15N polarization transfer via 1H chemical-shift anisotropy — 1H-15N dipole-dipole cross correlation // Journal of Magnetic Resonance (1969). 1992. Vol. 97, № 3. P. 645–650.
311. Riek R. et al. Polarization transfer by cross-correlated relaxation in solution NMR with very large molecules // Proc Natl Acad Sci U S A. 1999. Vol. 96, № 9. P. 4918–4923.
312. Kadavath H. et al. Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2015. Vol. 112, № 24. P. 7501–7506.
313. Weinhäupl K. et al. Structural Basis of Membrane Protein Chaperoning through the Mitochondrial Intermembrane Space // Cell. 2018. Vol. 175, № 5. P. 1365-1379.e25.
314. Cai S. et al. Sensitivity Enhancement of Multidimensional NMR Experiments by Paramagnetic Relaxation Effects // Journal of the American Chemical Society. 2006. Vol. 128, № 41. P. 13474–13478.
315. Hiller S. et al. Managing the solvent water polarization to obtain improved NMR spectra of large molecular structures // J. Biomol. NMR. 2005. Vol. 32, № 1. P. 61–70.
316. Ernst R.R., Anderson W.A. Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance // Review of Scientific Instruments. 1966. Vol. 37, № 1. P. 93–102.
317. Ross A., Salzmann M., Senn H. Fast-HMQC using Ernst angle pulses: An efficient tool for screening of ligand binding to target proteins // J. Biomol. NMR. 1997. Vol. 10, № 4. P. 389–396.
318. Pervushin K., Vögeli B., Eletsky A. Longitudinal ^{1}H Relaxation Optimization in TROSY NMR Spectroscopy // Journal of the American Chemical Society. 2002. Vol. 124, № 43. P. 12898–12902.
319. Schanda P., Brutscher B. Very fast two-dimensional NMR spectroscopy for real-time investigation of dynamic events in proteins on the time scale of seconds // J. Am. Chem. Soc. 2005. Vol. 127, № 22. P. 8014–8015.
320. Kupce E., Freeman R. Polychromatic Selective Pulses // Journal of Magnetic Resonance, Series A. 1993. Vol. 102, № 1. P. 122–126.

321. Kupce E., Boyd J., Campbell I.D. Short selective pulses for biochemical applications // J Magn Reson B. 1995. Vol. 106, № 3. P. 300–303.
322. Schanda P., Kupce E., Brutscher B. SOFAST-HMQC experiments for recording two-dimensional heteronuclear correlation spectra of proteins within a few seconds // J. Biomol. NMR. 2005. Vol. 33, № 4. P. 199–211.
323. Amero C. et al. Fast two-dimensional NMR spectroscopy of high molecular weight protein assemblies // J. Am. Chem. Soc. 2009. Vol. 131, № 10. P. 3448–3449.
324. Geen H., Freeman R. Band-selective radiofrequency pulses // Journal of Magnetic Resonance (1969). 1991. Vol. 93, № 1. P. 93–141.
325. Schanda P., Van Melckebeke H., Brutscher B. Speeding up three-dimensional protein NMR experiments to a few minutes // J. Am. Chem. Soc. 2006. Vol. 128, № 28. P. 9042–9043.
326. Lescop E., Schanda P., Brutscher B. A set of BEST triple-resonance experiments for time-optimized protein resonance assignment // Journal of Magnetic Resonance. 2007. Vol. 187, № 1. P. 163–169.
327. Favier A., Brutscher B. Recovering lost magnetization: polarization enhancement in biomolecular NMR // J. Biomol. NMR. 2011. Vol. 49, № 1. P. 9–15.
328. Solyom Z. et al. BEST-TROSY experiments for time-efficient sequential resonance assignment of large disordered proteins // Journal of Biomolecular NMR. 2013. Vol. 55, № 4. P. 311–321.
329. Felli I.C., Pierattelli R. Spin-state-selective methods in solution- and solid-state biomolecular 13C NMR // Prog Nucl Magn Reson Spectrosc. 2015. Vol. 84–85. P. 1–13.
330. Ernst R.R. Nuclear Magnetic Resonance Fourier Transform Spectroscopy (Nobel Lecture) // Angewandte Chemie International Edition in English. 1992. Vol. 31, № 7. P. 805–823.
331. Delaglio F. et al. Non-Uniform Sampling for All: More NMR Spectral Quality, Less Measurement Time // Am Pharm Rev. 2017. Vol. 20, № 4.
332. Kazimierczuk K., Orekhov V.Y. A comparison of convex and non-convex compressed sensing applied to multidimensional NMR // J. Magn. Reson. 2012. Vol. 223. P. 1–10.
333. Shrot Y., Frydman L. Compressed Sensing Reconstruction of Ultrafast 2D NMR Data: Principles and Biomolecular Applications // J Magn Reson. 2011. Vol. 209, № 2. P. 352–358.
334. Mayzel M., Kazimierczuk K., Orekhov V.Y. The causality principle in the reconstruction of sparse NMR spectra // Chem. Commun. (Camb.). 2014. Vol. 50, № 64. P. 8947–8950.
335. Orekhov V.Y., Jaravine V.A. Analysis of non-uniformly sampled spectra with multi-dimensional decomposition // Prog Nucl Magn Reson Spectrosc. 2011. Vol. 59, № 3. P. 271–292.
336. Kazimierczuk K., Orekhov V. Non-uniform sampling: post-Fourier era of NMR data collection and processing: Non-uniform sampling // Magnetic Resonance in Chemistry. 2015. Vol. 53, № 11. P. 921–926.
337. Mayzel M. et al. Time-resolved multidimensional NMR with non-uniform sampling // J. Biomol. NMR. 2014. Vol. 58, № 2. P. 129–139.
338. Mayzel M. et al. Measurement of protein backbone 13CO and 15N relaxation dispersion at high resolution // J. Biomol. NMR. 2017. Vol. 69, № 1. P. 1–12.
339. Kazimierczuk K., Zawadzka A., Koźmiński W. Optimization of random time domain sampling in multidimensional NMR // Journal of Magnetic Resonance. 2008. Vol. 192, № 1. P. 123–130.
340. Wishart D.S., Sykes B.D., Richards F.M. Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure // J. Mol. Biol. 1991. Vol. 222, № 2. P. 311–333.
341. Cornilescu G., Delaglio F., Bax A. Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology // J. Biomol. NMR. 1999. Vol. 13, № 3. P. 289–302.
342. Shen Y. et al. TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts // Journal of Biomolecular NMR. 2009. Vol. 44, № 4. P. 213–223.
343. Shen Y., Bax A. Protein structural information derived from NMR chemical shift with the neural network program TALOS-N // Methods Mol. Biol. 2015. Vol. 1260. P. 17–32.

344. Simons K.T. et al. Assembly of protein tertiary structures from fragments with similar local sequences using simulated annealing and Bayesian scoring functions // J. Mol. Biol. 1997. Vol. 268, № 1. P. 209–225.
345. Shen Y., Bax A. SPARTA+: a modest improvement in empirical NMR chemical shift prediction by means of an artificial neural network // J. Biomol. NMR. 2010. Vol. 48, № 1. P. 13–22.
346. Nerli S., Sgourakis N.G. CS-ROSETTA // Meth. Enzymol. 2019. Vol. 614. P. 321–362.
347. Colvin M.T. et al. High resolution structural characterization of Aβ42 amyloid fibrils by magic angle spinning NMR // J. Am. Chem. Soc. 2015. Vol. 137, № 23. P. 7509–7518.
348. Kassem M.M. et al. Structure of the Bacterial Cytoskeleton Protein Bactofilin by NMR Chemical Shifts and Sequence Variation // Biophys. J. 2016. Vol. 110, № 11. P. 2342–2348.
349. Morag O. et al. The NMR-Rosetta capsid model of M13 bacteriophage reveals a quadrupled hydrophobic packing epitope // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2015. Vol. 112, № 4. P. 971–976.
350. Vögeli B. et al. Towards a true protein movie: a perspective on the potential impact of the ensemble-based structure determination using exact NOEs // J. Magn. Reson. 2014. Vol. 241. P. 53–59.
351. Vögeli B. et al. Exact Distances and Internal Dynamics of Perdeuterated Ubiquitin from NOE Buildups // J. Am. Chem. Soc. 2009. Vol. 131, № 47. P. 17215–17225.
352. Nichols P.J. et al. Extending the Applicability of Exact Nuclear Overhauser Enhancements to Large Proteins and RNA // Chembiochem. 2018.
353. Sjodt M., Clubb R. Nitroxide Labeling of Proteins and the Determination of Paramagnetic Relaxation Derived Distance Restraints for NMR Studies // BIO-PROTOCOL. 2017. Vol. 7, № 7.
354. Roser P. et al. Site-directed spin labeling of proteins for distance measurements in vitro and in cells // Org. Biomol. Chem. 2016. Vol. 14, № 24. P. 5468–5476.
355. Chen K., Tjandra N. The use of residual dipolar coupling in studying proteins by NMR // Top Curr Chem. 2012. Vol. 326. P. 47–67.
356. Prestegard J.H., Bougault C.M., Kishore A.I. Residual Dipolar Couplings in Structure Determination of Biomolecules // Chem. Rev. 2004. Vol. 104, № 8. P. 3519–3540.
357. Sass H.J. et al. Solution NMR of proteins within polyacrylamide gels: diffusional properties and residual alignment by mechanical stress or embedding of oriented purple membranes // J. Biomol. NMR. 2000. Vol. 18, № 4. P. 303–309.
358. Lorieau J., Yao L., Bax A. Liquid Crystalline Phase of G-Tetrad DNA for NMR Study of Detergent-Solubilized Proteins // Journal of the American Chemical Society. 2008. Vol. 130, № 24. P. 7536–7537.
359. Bibow S. et al. Measuring membrane protein bond orientations in nanodiscs via residual dipolar couplings // Protein Sci. 2014. Vol. 23, № 7. P. 851–856.
360. Ou S.-H.I. et al. HER2 Transmembrane Domain (TMD) Mutations (V659/G660) That Stabilize Homo- and Heterodimerization Are Rare Oncogenic Drivers in Lung Adenocarcinoma That Respond to Afatinib // J Thorac Oncol. 2017. Vol. 12, № 3. P. 446–457.
361. van Rhijn B.W.G. et al. Novel fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutations in bladder cancer previously identified in non-lethal skeletal disorders // Eur. J. Hum. Genet. 2002. Vol. 10, № 12. P. 819–824.
362. Bennasroune A. et al. Transmembrane peptides as inhibitors of ErbB receptor signaling // Mol. Biol. Cell. 2004. Vol. 15, № 7. P. 3464–3474.
363. Bennasroune A. et al. Inhibition by transmembrane peptides of chimeric insulin receptors // Cell. Mol. Life Sci. 2005. Vol. 62, № 18. P. 2124–2131.
364. Lemmon M.A. et al. Sequence specificity in the dimerization of transmembrane alpha-helices // Biochemistry. 1992. Vol. 31, № 51. P. 12719–12725.
365. Verardi R. et al. Structural topology of phospholamban pentamer in lipid bilayers by a hybrid solution and solid-state NMR method // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2011. Vol. 108, № 22. P. 9101–9106.

366. Wang X. et al. Targeting the lateral interactions of transmembrane domain 5 of Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2012. Vol. 1818, № 9. P. 2282–2289.
367. Fleming K.G. Determination of Membrane Protein Molecular Weight Using Sedimentation Equilibrium Analytical Ultracentrifugation // Current Protocols in Protein Science / ed. Coligan J.E. et al. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2008. P. 7.12.1-7.12.13.
368. Fleming K.G., Ackerman A.L., Engelman D.M. The effect of point mutations on the free energy of transmembrane alpha-helix dimerization // J. Mol. Biol. 1997. Vol. 272, № 2. P. 266–275.
369. Kobus F.J., Fleming K.G. The GxxxG-containing transmembrane domain of the CCK4 oncogene does not encode preferential self-interactions // Biochemistry. 2005. Vol. 44, № 5. P. 1464–1470.
370. Stanley A.M., Fleming K.G. The Transmembrane Domains of ErbB Receptors do not Dimerize Strongly in Micelles // Journal of Molecular Biology. 2005. Vol. 347, № 4. P. 759–772.
371. Sammond D.W. et al. Transmembrane peptides used to investigate the homo-oligomeric interface and binding hotspot of latent membrane protein 1 // Biopolymers. 2011. Vol. 95, № 11. P. 772–784.
372. Reynolds J.A., Tanford C. Determination of molecular weight of the protein moiety in protein-detergent complexes without direct knowledge of detergent binding // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1976. Vol. 73, № 12. P. 4467–4470.
373. Fleming K.G. Specificity in transmembrane helix-helix interactions can define a hierarchy of stability for sequence variants // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001. Vol. 98, № 25. P. 14340–14344.
374. Fleming K.G. Standardizing the Free Energy Change of Transmembrane Helix–Helix Interactions // Journal of Molecular Biology. 2002. Vol. 323, № 3. P. 563–571.
375. Kochendoerfer G.G. et al. Total chemical synthesis of the integral membrane protein influenza A virus M2: role of its C-terminal domain in tetramer assembly // Biochemistry. 1999. Vol. 38, № 37. P. 11905–11913.
376. Fisher L.E., Engelman D.M., Sturgis J.N. Detergents modulate dimerization, but not helicity, of the glycophorin A transmembrane domain // J. Mol. Biol. 1999. Vol. 293, № 3. P. 639–651.
377. Merzlyakov M. et al. Transmembrane helix heterodimerization in lipid bilayers: probing the energetics behind autosomal dominant growth disorders // J. Mol. Biol. 2006. Vol. 358, № 1. P. 1–7.
378. Sarabipour S., Hristova K. Glycophorin A transmembrane domain dimerization in plasma membrane vesicles derived from CHO, HEK 293T, and A431 cells // Biochim. Biophys. Acta. 2013. Vol. 1828, № 8. P. 1829–1833.
379. King C. et al. The FRET signatures of noninteracting proteins in membranes: simulations and experiments // Biophys. J. 2014. Vol. 106, № 6. P. 1309–1317.
380. Situ A.J. et al. Characterization of membrane protein interactions by isothermal titration calorimetry // J. Mol. Biol. 2014. Vol. 426, № 21. P. 3670–3680.
381. Schmidt T. et al. A Conserved Ectodomain-Transmembrane Domain Linker Motif Tunes the Allosteric Regulation of Cell Surface Receptors // J. Biol. Chem. 2016. Vol. 291, № 34. P. 17536–17546.
382. Russ W.P., Engelman D.M. TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999. Vol. 96, № 3. P. 863–868.
383. Langosch D. et al. Dimerisation of the glycophorin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator // J. Mol. Biol. 1996. Vol. 263, № 4. P. 525–530.
384. Armstrong C.R., Senes A. Screening for transmembrane association in divisome proteins using TOXGREEN, a high-throughput variant of the TOXCAT assay // Biochim. Biophys. Acta. 2016. Vol. 1858, № 11. P. 2573–2583.
385. Berger B.W. et al. Consensus motif for integrin transmembrane helix association // PNAS. 2010. Vol. 107, № 2. P. 703–708.

386. Mendrola J.M. et al. The Single Transmembrane Domains of ErbB Receptors Self-associate in Cell Membranes // Journal of Biological Chemistry. 2002. Vol. 277, № 7. P. 4704–4712.
387. Finger C., Escher C., Schneider D. The Single Transmembrane Domains of Human Receptor Tyrosine Kinases Encode Self-Interactions // Science Signaling. 2009. Vol. 2, № 89. P. ra56–ra56.
388. Volynsky P.E. et al. Computer simulations and modeling-assisted ToxR screening in deciphering 3D structures of transmembrane α-helical dimers: ephrin receptor A1 // Physical Biology. 2010. Vol. 7, № 1. P. 016014.
389. Molecular cell biology. 6th ed / ed. Lodish H.F. New York: W.H. Freeman, 2008. 1 p.
390. Chen P.-H., Unger V., He X. Structure of Full-Length Human PDGFRβ Bound to Its Activating Ligand PDGF-B as Determined by Negative-Stain Electron Microscopy // Journal of Molecular Biology. 2015. Vol. 427, № 24. P. 3921–3934.
391. Lemmon M.A., Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases // Cell. 2010. Vol. 141, № 7. P. 1117–1134.
392. Kumar H., Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and innate immunity // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. Vol. 388, № 4. P. 621–625.
393. Cook D.N., Pisetsky D.S., Schwartz D.A. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease // Nat. Immunol. 2004. Vol. 5, № 10. P. 975–979.
394. Gentry J.J., Barker P.A., Carter B.D. The p75 neurotrophin receptor: multiple interactors and numerous functions // Prog. Brain Res. 2004. Vol. 146. P. 25–39.
395. Duneau J.-P., Vegh A.P., Sturgis J.N. A dimerization hierarchy in the transmembrane domains of the HER receptor family // Biochemistry. 2007. Vol. 46, № 7. P. 2010–2019.
396. Dosch D.D., Ballmer-Hofer K. Transmembrane domain-mediated orientation of receptor monomers in active VEGFR-2 dimers // FASEB J. 2010. Vol. 24, № 1. P. 32–38.
397. Godfroy J.I. et al. Isolated Toll-like Receptor Transmembrane Domains Are Capable of Oligomerization // PLoS ONE / ed. Gay N. 2012. Vol. 7, № 11. P. e48875.
398. Bargmann C.I., Hung M.C., Weinberg R.A. Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185 // Cell. 1986. Vol. 45, № 5. P. 649–657.
399. Kisko K. et al. Structural analysis of vascular endothelial growth factor receptor-2/ligand complexes by small-angle X-ray solution scattering // FASEB J. 2011. Vol. 25, № 9. P. 2980–2986.
400. Sarabipour S., Ballmer-Hofer K., Hristova K. VEGFR-2 conformational switch in response to ligand binding // Elife. 2016. Vol. 5.
401. Vilar M. et al. Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers // Neuron. 2009. Vol. 62, № 1. P. 72–83.
402. Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor // Cell. 2002. Vol. 110, № 6. P. 669–672.
403. Vyncke L. et al. Reconstructing the TIR Side of the Myddosome: a Paradigm for TIR-TIR Interactions // Structure. 2016. Vol. 24, № 3. P. 437–447.
404. Moriki T., Maruyama H., Maruyama I.N. Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain // J. Mol. Biol. 2001. Vol. 311, № 5. P. 1011–1026.
405. Tao R.-H., Maruyama I.N. All EGF(ErbB) receptors have preformed homo- and heterodimeric structures in living cells // Journal of Cell Science. 2008. Vol. 121, № 19. P. 3207–3217.
406. Jura N. et al. Mechanism for Activation of the EGF Receptor Catalytic Domain by the Juxtamembrane Segment // Cell. 2009. Vol. 137, № 7. P. 1293–1307.
407. Sarabipour S., Hristova K. Mechanism of FGF receptor dimerization and activation // Nat Commun. 2016. Vol. 7. P. 10262.
408. Arkhipov A. et al. Architecture and Membrane Interactions of the EGF Receptor // Cell. 2013. Vol. 152, № 3. P. 557–569.

409. Coulson E.J. et al. Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275, № 39. P. 30537–30545.
410. Coulson E.J. et al. The role of neurotransmission and the Chopper domain in p75 neurotrophin receptor death signaling // Prog. Brain Res. 2004. Vol. 146. P. 41–62.
411. Lemmon M.A. et al. Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane alpha-helices // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267, № 11. P. 7683–7689.
412. Vold R.R., Prosser R.S. Magnetically Oriented Phospholipid Bilayered Micelles for Structural Studies of Polypeptides. Does the Ideal Bicelle Exist? // Journal of Magnetic Resonance, Series B. 1996. Vol. 113, № 3. P. 267–271.
413. Nagle J.F., Tristram-Nagle S. Structure of lipid bilayers // Biochim. Biophys. Acta. 2000. Vol. 1469, № 3. P. 159–195.
414. Lin T.Lang. et al. The use of small-angle neutron scattering to determine the structure and interaction of dihexanoylphosphatidylcholine micelles // J. Am. Chem. Soc. 1986. Vol. 108, № 12. P. 3499–3507.
415. Lipfert J. et al. Size and Shape of Detergent Micelles Determined by Small-Angle X-ray Scattering // The Journal of Physical Chemistry B. 2007. Vol. 111, № 43. P. 12427–12438.
416. Herrera F.E., Garay A.S., Rodrigues D.E. Structural Properties of CHAPS Micelles, Studied by Molecular Dynamics Simulations // The Journal of Physical Chemistry B. 2014. Vol. 118, № 14. P. 3912–3921.
417. Ortega A., García de la Torre J. Hydrodynamic properties of rodlike and disklike particles in dilute solution // The Journal of Chemical Physics. 2003. Vol. 119, № 18. P. 9914.
418. Jerschow A., Müller N. Suppression of Convection Artifacts in Stimulated-Echo Diffusion Experiments. Double-Stimulated-Echo Experiments // Journal of Magnetic Resonance. 1997. Vol. 125, № 2. P. 372–375.
419. Zheng G., Price W.S. Simultaneous convection compensation and solvent suppression in biomolecular NMR diffusion experiments // Journal of Biomolecular NMR. 2009. Vol. 45, № 3. P. 295–299.
420. Jóhannesson H., Halle B. Solvent diffusion in ordered macrofluids: A stochastic simulation study of the obstruction effect // The Journal of Chemical Physics. 1996. Vol. 104, № 17. P. 6807.
421. Lind J., Nordin J., Mäler L. Lipid dynamics in fast-tumbling bicelles with varying bilayer thickness: effect of model transmembrane peptides // Biochim. Biophys. Acta. 2008. Vol. 1778, № 11. P. 2526–2534.
422. Genji T., Nozawa A., Tozawa Y. Efficient production and purification of functional bacteriorhodopsin with a wheat-germ cell-free system and a combination of Fos-choline and CHAPS detergents // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010. Vol. 400, № 4. P. 638–642.
423. Ye W. et al. Characterization of the morphology of fast-tumbling bicelles with varying composition // Langmuir. 2014. Vol. 30, № 19. P. 5488–5496.
424. Lee S.C. et al. Steroid-based facial amphiphiles for stabilization and crystallization of membrane proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2013. Vol. 110, № 13. P. E1203-1211.
425. Hauser H. Short-chain phospholipids as detergents // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2000. Vol. 1508, № 1–2. P. 164–181.
426. Kučerka N., Nieh M.-P., Katsaras J. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature // Biochim. Biophys. Acta. 2011. Vol. 1808, № 11. P. 2761–2771.
427. Piazza R., Degiorgio V. Rotational diffusion of hard spheres: forward depolarized light-scattering measurements and comparison to theory and simulation // Journal of Physics: Condensed Matter. 1996. Vol. 8, № 47. P. 9497–9502.
428. Schumann F.H. et al. Combined chemical shift changes and amino acid specific chemical shift mapping of protein-protein interactions // J. Biomol. NMR. 2007. Vol. 39, № 4. P. 275–289.

429. Koynova R., Tenchov B. Lipids: Phase Transitions // Wiley Encyclopedia of Chemical Biology. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2008.
430. Samsonov A.V., Mihalyov I., Cohen F.S. Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes // Biophys. J. 2001. Vol. 81, № 3. P. 1486–1500.
431. Morales H.H., Saleem Q., Macdonald P.M. Thermal Stabilization of Bicelles by a Bile-Salt-Derived Detergent: A Combined ^{31} P and ^{2} H Nuclear Magnetic Resonance Study // Langmuir. 2014. Vol. 30, № 50. P. 15219–15228.
432. Czerski L., Sanders C.R. Functionality of a membrane protein in bicelles // Anal. Biochem. 2000. Vol. 284, № 2. P. 327–333.
433. Sanders C.R., Landis G.C. Reconstitution of membrane proteins into lipid-rich bilayered mixed micelles for NMR studies // Biochemistry. 1995. Vol. 34, № 12. P. 4030–4040.
434. Pawar A.B., Sengupta D. Effect of Membrane Composition on Receptor Association: Implications of Cancer Lipidomics on ErbB Receptors // J. Membr. Biol. 2018.
435. Fantini J. et al. Molecular mechanisms of protein-cholesterol interactions in plasma membranes: Functional distinction between topological (tilted) and consensus (CARC/CRAC) domains // Chem. Phys. Lipids. 2016. Vol. 199. P. 52–60.
436. Nicolson G.L. The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years // Biochim. Biophys. Acta. 2014. Vol. 1838, № 6. P. 1451–1466.
437. Ipsen J.H. et al. Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system // Biochim. Biophys. Acta. 1987. Vol. 905, № 1. P. 162–172.
438. Schuck S. et al. Resistance of cell membranes to different detergents // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003. Vol. 100, № 10. P. 5795–5800.
439. Luckey M. Membrane Structural Biology: With Biochemical and Biophysical Foundations. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.
440. Khan H.M. et al. A Role for Weak Electrostatic Interactions in Peripheral Membrane Protein Binding // Biophys J. 2016. Vol. 110, № 6. P. 1367–1378.
441. Güler G. et al. Lipid-Protein Interactions in the Regulated Betaine Symporter BetP Probed by Infrared Spectroscopy // J. Biol. Chem. 2016. Vol. 291, № 9. P. 4295–4307.
442. van Klompenburg W. et al. Anionic phospholipids are determinants of membrane protein topology // EMBO J. 1997. Vol. 16, № 14. P. 4261–4266.
443. Schmidt T. et al. Annular anionic lipids stabilize the integrin αIIbβ3 transmembrane complex // J. Biol. Chem. 2015. Vol. 290, № 13. P. 8283–8293.
444. Coronado R. Effect of divalent cations on the assembly of neutral and charged phospholipid bilayers in patch-recording pipettes // Biophys. J. 1985. Vol. 47, № 6. P. 851–857.
445. Hauser H. Effect of inorganic cations on phase transitions // Chemistry and Physics of Lipids. 1991. Vol. 57, № 2. P. 309–325.
446. Svetlovics J.A., Wheaten S.A., Almeida P.F. Phase Separation and Fluctuations in Mixtures of a Saturated and an Unsaturated Phospholipid // Biophys J. 2012. Vol. 102, № 11. P. 2526–2535.
447. Grouleff J. et al. The influence of cholesterol on membrane protein structure, function, and dynamics studied by molecular dynamics simulations // Biochim. Biophys. Acta. 2015. Vol. 1848, № 9. P. 1783–1795.
448. Pan J., Tristram-Nagle S., Nagle J.F. Effect of cholesterol on structural and mechanical properties of membranes depends on lipid chain saturation // Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys. 2009. Vol. 80, № 2 Pt 1. P. 021931.
449. Deatherage C.L. et al. Structural and biochemical differences between the Notch and the amyloid precursor protein transmembrane domains // Sci Adv. 2017. Vol. 3, № 4. P. e1602794.
450. de Meyer F.J.-M. et al. Molecular simulation of the effect of cholesterol on lipid-mediated protein-protein interactions // Biophys. J. 2010. Vol. 99, № 11. P. 3629–3638.

451. Heldin C.H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction // Cell. 1995. Vol. 80, № 2. P. 213–223.
452. Mineev K.S. et al. The Membrane Mimetic Affects the Spatial Structure and Mobility of EGFR Transmembrane and Juxtamembrane Domains // Biochemistry. 2015. Vol. 54, № 41. P. 6295–6298.
453. Güntert P., Braun W., Wüthrich K. Efficient computation of three-dimensional protein structures in solution from nuclear magnetic resonance data using the program DIANA and the supporting programs CALIBA, HABAS and GLOMSA // J. Mol. Biol. 1991. Vol. 217, № 3. P. 517–530.
454. Zwahlen C. et al. Methods for Measurement of Intermolecular NOEs by Multinuclear NMR Spectroscopy: Application to a Bacteriophage λ N-Peptide/boxB RNA Complex // J. Am. Chem. Soc. 1997. Vol. 119, № 29. P. 6711–6721.
455. Trenker R., Call M.E., Call M.J. Crystal Structure of the Glycophorin A Transmembrane Dimer in Lipidic Cubic Phase // Journal of the American Chemical Society. 2015. Vol. 137, № 50. P. 15676–15679.
456. Mineev K.S. et al. Dimeric structure of the transmembrane domain of glycophorin a in lipidic and detergent environments // Acta Naturae. 2011. Vol. 3, № 2. P. 90–98.
457. Bocharov E.V. et al. Unique dimeric structure of BNip3 transmembrane domain suggests membrane permeabilization as a cell death trigger // J. Biol. Chem. 2007. Vol. 282, № 22. P. 16256–16266.
458. Bocharov E.V. et al. Spatial structure of the dimeric transmembrane domain of the growth factor receptor ErbB2 presumably corresponding to the receptor active state // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283, № 11. P. 6950–6956.
459. Bocharov E.V. et al. Spatial structure and pH-dependent conformational diversity of dimeric transmembrane domain of the receptor tyrosine kinase EphA1 // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283, № 43. P. 29385–29395.
460. Ikura M., Bax A. Isotope-filtered 2D NMR of a protein-peptide complex: study of a skeletal muscle myosin light chain kinase fragment bound to calmodulin // J. Am. Chem. Soc. 1992. Vol. 114, № 7. P. 2433–2440.
461. Lesovoy D.M. et al. NMR relaxation parameters of methyl groups as a tool to map the interfaces of helix-helix interactions in membrane proteins // J. Biomol. NMR. 2017. Vol. 69, № 3. P. 165–179.
462. Stuart A.C. et al. Compensating for Variations in 1 H−13C Scalar Coupling Constants in Isotope-Filtered NMR Experiments // J. Am. Chem. Soc. 1999. Vol. 121, № 22. P. 5346–5347.
463. Rosen M.K. et al. Selective methyl group protonation of perdeuterated proteins // J. Mol. Biol. 1996. Vol. 263, № 5. P. 627–636.
464. Kupce E., Wagner G. Multisite band-selective decoupling in proteins // J Magn Reson B. 1996. Vol. 110, № 3. P. 309–312.
465. Kupče Ē., Wagner G. Wideband Homonuclear Decoupling in Protein Spectra // Journal of Magnetic Resonance, Series B. 1995. Vol. 109, № 3. P. 329–333.
466. Bloch F., Siegert A. Magnetic Resonance for Nonrotating Fields // Phys. Rev. 1940. Vol. 57, № 6. P. 522–527.
467. Mineev K.S. et al. Spatial structure and dimer--monomer equilibrium of the ErbB3 transmembrane domain in DPC micelles // Biochim. Biophys. Acta. 2011. Vol. 1808, № 8. P. 2081–2088.
468. Manni S. et al. Structural and functional characterization of alternative transmembrane domain conformations in VEGF receptor 2 activation // Structure. 2014. Vol. 22, № 8. P. 1077–1089.
469. Bax A., Mehlkopf A.F., Smidt J. Homonuclear broadband-decoupled absorption spectra, with linewidths which are independent of the transverse relaxation rate // Journal of Magnetic Resonance (1969). 1979. Vol. 35, № 1. P. 167–169.

470. Williamson M.P. Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding // Prog Nucl Magn Reson Spectrosc. 2013. Vol. 73. P. 1–16.
471. Bocharov E.V. et al. Alternative packing of EGFR transmembrane domain suggests that protein-lipid interactions underlie signal conduction across membrane // Biochim. Biophys. Acta. 2016. Vol. 1858, № 6. P. 1254–1261.
472. Kumar A. Cross-correlations in NMR // Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. 2000. Vol. 37, № 3. P. 191–319.
473. Zhang X., Sui X., Yang D. Probing Methyl Dynamics from ^{13}C Autocorrelated and Cross-Correlated Relaxation // J. Am. Chem. Soc. 2006. Vol. 128, № 15. P. 5073–5081.
474. Yang D. Probing Protein Side Chain Dynamics Via 13C NMR Relaxation // Protein & Peptide Letters. 2011. Vol. 18, № 4. P. 380–395.
475. Carlomagno T., Griesinger C. Errors in the Measurement of Cross-Correlated Relaxation Rates and How to Avoid Them // Journal of Magnetic Resonance. 2000. Vol. 144, № 2. P. 280–287.
476. Jin C., Prompers J.J., Brüschweiler R. Cross-correlation suppressed T1 and NOE experiments for protein side-chain 13CH2 groups // J. Biomol. NMR. 2003. Vol. 26, № 3. P. 241–247.
477. Lomize A.L., Pogozheva I.D. TMDOCK: An Energy-Based Method for Modeling α-Helical Dimers in Membranes // J. Mol. Biol. 2017. Vol. 429, № 3. P. 390–398.
478. Polyansky A.A. et al. PREDDIMER: a web server for prediction of transmembrane helical dimers // Bioinformatics. 2014. Vol. 30, № 6. P. 889–890.
479. Wang Y., Barth P. Evolutionary-guided de novo structure prediction of self-associated transmembrane helical proteins with near-atomic accuracy // Nat Commun. 2015. Vol. 6. P. 7196.
480. Walters R.F.S., DeGrado W.F. Helix-packing motifs in membrane proteins // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2006. Vol. 103, № 37. P. 13658–13663.
481. Zhang S.-Q. et al. The membrane- and soluble-protein helix-helix interactome: similar geometry via different interactions // Structure. 2015. Vol. 23, № 3. P. 527–541.
482. Mineev K.S. et al. Spatial structure of the transmembrane domain heterodimer of ErbB1 and ErbB2 receptor tyrosine kinases // J. Mol. Biol. 2010. Vol. 400, № 2. P. 231–243.
483. Bocharov E.V. et al. Structural and thermodynamic insight into the process of “weak” dimerization of the ErbB4 transmembrane domain by solution NMR // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2012. Vol. 1818, № 9. P. 2158–2170.
484. Bocharov E.V. et al. The Conformation of the Epidermal Growth Factor Receptor Transmembrane Domain Dimer Dynamically Adapts to the Local Membrane Environment // Biochemistry. 2017. Vol. 56, № 12. P. 1697–1705.
485. Bocharov E.V. et al. Left-handed dimer of EphA2 transmembrane domain: Helix packing diversity among receptor tyrosine kinases // Biophys. J. 2010. Vol. 98, № 5. P. 881–889.
486. Bocharov E.V. et al. Structural basis of the signal transduction via transmembrane domain of the human growth hormone receptor // Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2018. Vol. 1862, № 6. P. 1410–1420.
487. Lemmon M.A. Ligand-induced ErbB receptor dimerization // Exp. Cell Res. 2009. Vol. 315, № 4. P. 638–648.
488. Bocharov E.V. et al. Helix-helix interactions in membrane domains of bitopic proteins: Specificity and role of lipid environment // Biochim. Biophys. Acta. 2017. Vol. 1859, № 4. P. 561–576.
489. Cordier F., Barfield M., Grzesiek S. Direct observation of Calpha-Halpha...O=C hydrogen bonds in proteins by interresidue h3JCalphaC’ scalar couplings // J. Am. Chem. Soc. 2003. Vol. 125, № 51. P. 15750–15751.
490. Manikandan K., Ramakumar S. The occurrence of C--H...O hydrogen bonds in alpha-helices and helix termini in globular proteins // Proteins. 2004. Vol. 56, № 4. P. 768–781.

491. Mottamal M., Lazaridis T. The contribution of C alpha-H...O hydrogen bonds to membrane protein stability depends on the position of the amide // Biochemistry. 2005. Vol. 44, № 5. P. 1607–1613.
492. Park H., Yoon J., Seok C. Strength of Calpha-H...O=C hydrogen bonds in transmembrane proteins // J Phys Chem B. 2008. Vol. 112, № 3. P. 1041–1048.
493. Botos I., Segal D.M., Davies D.R. The structural biology of Toll-like receptors // Structure. 2011. Vol. 19, № 4. P. 447–459.
494. Dunne A. et al. Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88 // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278, № 42. P. 41443–41451.
495. Reuven E.M., Fink A., Shai Y. Regulation of innate immune responses by transmembrane interactions: Lessons from the TLR family // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2014. Vol. 1838, № 6. P. 1586–1593.
496. Nishiya T., Kajita E., Miwa S. Ligand-independent oligomerization of TLR4 regulated by a short hydrophobic region adjacent to the transmembrane domain // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. Vol. 341, № 4. P. 1128–1134.
497. Daringer N.M., Schwarz K.A., Leonard J.N. Contributions of unique intracellular domains to switchlike biosensing by Toll-like receptor 4 // J. Biol. Chem. 2015. Vol. 290, № 14. P. 8764–8777.
498. Liu L. et al. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA // Science. 2008. Vol. 320, № 5874. P. 379–381.
499. Lemmon M.A., Schlessinger J., Ferguson K.M. The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases // Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014. Vol. 6, № 4. P. a020768.
500. Nyman T. et al. The crystal structure of the human toll-like receptor 10 cytoplasmic domain reveals a putative signaling dimer // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283, № 18. P. 11861–11865.
501. Thurlkill R.L. et al. pK values of the ionizable groups of proteins // Protein Sci. 2006. Vol. 15, № 5. P. 1214–1218.
502. Wimley W.C., White S.H. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces // Nat. Struct. Biol. 1996. Vol. 3, № 10. P. 842–848.
503. Hwang T.L., van Zijl P.C., Mori S. Accurate quantitation of water-amide proton exchange rates using the phase-modulated CLEAN chemical EXchange (CLEANEX-PM) approach with a Fast-HSQC (FHSQC) detection scheme // J. Biomol. NMR. 1998. Vol. 11, № 2. P. 221–226.
504. Park B.S. et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex // Nature. 2009. Vol. 458, № 7242. P. 1191–1195.
505. Nietlispach D. Suppression of anti-TROSY lines in a sensitivity enhanced gradient selection TROSY scheme // J. Biomol. NMR. 2005. Vol. 31, № 2. P. 161–166.
506. Fisher L.E., Engelman D.M., Sturgis J.N. Effect of detergents on the association of the glycophorin a transmembrane helix // Biophys. J. 2003. Vol. 85, № 5. P. 3097–3105.
507. Farrow N.A. et al. Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by 15N NMR relaxation // Biochemistry. 1994. Vol. 33, № 19. P. 5984–6003.
508. Choy W.-Y. et al. An 15N NMR spin relaxation dispersion study of the folding of a pair of engineered mutants of apocytochrome b562 // J. Am. Chem. Soc. 2005. Vol. 127, № 14. P. 5066–5072.
509. Placone J., Hristova K. Direct assessment of the effect of the Gly380Arg achondroplasia mutation on FGFR3 dimerization using quantitative imaging FRET // PLoS ONE. 2012. Vol. 7, № 10. P. e46678.
510. Del Piccolo N., Placone J., Hristova K. Effect of thanatophoric dysplasia type I mutations on FGFR3 dimerization // Biophys. J. 2015. Vol. 108, № 2. P. 272–278.
511. He L., Hristova K. Physical-chemical principles underlying RTK activation, and their implications for human disease // Biochim. Biophys. Acta. 2012. Vol. 1818, № 4. P. 995–1005.

512. Placone J. et al. Strong dimerization of wild-type ErbB2/Neu transmembrane domain and the oncogenic Val664Glu mutant in mammalian plasma membranes // Biochim. Biophys. Acta. 2014. Vol. 1838, № 9. P. 2326–2330.
513. Lu Y.-C., Chen H.-C. Involvement of lipid rafts in adhesion-induced activation of Met and EGFR // J. Biomed. Sci. 2011. Vol. 18. P. 78.
514. Polyansky A.A., Volynsky P.E., Efremov R.G. Multistate organization of transmembrane helical protein dimers governed by the host membrane // J. Am. Chem. Soc. 2012. Vol. 134, № 35. P. 14390–14400.
515. Sparr E. et al. Self-association of transmembrane alpha-helices in model membranes: importance of helix orientation and role of hydrophobic mismatch // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, № 47. P. 39324–39331.
516. Duneau J.-P., Sturgis J.N. Lateral organization of biological membranes: role of long-range interactions // Eur. Biophys. J. 2013. Vol. 42, № 11–12. P. 843–850.
517. Cubillos-Rojas M. et al. Analysis of Protein Oligomerization by Electrophoresis // Proteostasis: Methods and Protocols / ed. Matthiesen R. New York, NY: Springer New York, 2016. P. 341–348.
518. Zhang J., Lazaridis T. Calculating the free energy of association of transmembrane helices // Biophys. J. 2006. Vol. 91, № 5. P. 1710–1723.
519. Bragin P.E. et al. Probing the effect of membrane contents on transmembrane protein-protein interaction using solution NMR and computer simulations // Biochim Biophys Acta Biomembr. 2018. Vol. 1860, № 12. P. 2486–2498.
520. Mineev K.S., Goncharuk S.A., Arseniev A.S. Toll-like receptor 3 transmembrane domain is able to perform various homotypic interactions: an NMR structural study // FEBS Lett. 2014. Vol. 588, № 21. P. 3802–3807.
521. Mineev K.S. et al. NMR-based approach to measure the free energy of transmembrane helix–helix interactions // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2014. Vol. 1838, № 1. P. 164–172.
522. Nadezhdin K.D. et al. Structural Basis of p75 Transmembrane Domain Dimerization // Journal of Biological Chemistry. 2016. Vol. 291, № 23. P. 12346–12357.
523. Chen L. et al. Measuring the energetics of membrane protein dimerization in mammalian membranes // J. Am. Chem. Soc. 2010. Vol. 132, № 10. P. 3628–3635.
524. López-Mirabal H.R., Winther J.R. Redox characteristics of the eukaryotic cytosol // Biochim. Biophys. Acta. 2008. Vol. 1783, № 4. P. 629–640.
525. Red Brewer M. et al. The juxtamembrane region of the EGF receptor functions as an activation domain // Mol. Cell. 2009. Vol. 34, № 6. P. 641–651.
526. Pyrkov T.V. et al. PLATINUM: a web tool for analysis of hydrophobic/hydrophilic organization of biomolecular complexes // Bioinformatics. 2009. Vol. 25, № 9. P. 1201–1202.
527. Liepinsh E. et al. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor // EMBO J. 1997. Vol. 16, № 16. P. 4999–5005.
528. Xu Y. et al. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains // Nature. 2000. Vol. 408, № 6808. P. 111–115.
529. Sanfelice D. et al. NMR backbone assignments of the tyrosine kinase domain of human fibroblast growth factor receptor 3 in apo state and in complex with inhibitor PD173074 // Biomol NMR Assign. 2018. Vol. 12, № 2. P. 231–235.
530. Vilar M. et al. Heterodimerization of p45-p75 modulates p75 signaling: structural basis and mechanism of action // PLoS Biol. 2014. Vol. 12, № 8. P. e1001918.
531. García de la Torre J., Huertas M.L., Carrasco B. HYDRONMR: Prediction of NMR Relaxation of Globular Proteins from Atomic-Level Structures and Hydrodynamic Calculations // Journal of Magnetic Resonance. 2000. Vol. 147, № 1. P. 138–146.
532. Fushman D., Tjandra N., Cowburn D. Direct Measurement of 15N Chemical Shift Anisotropy in Solution // J. Am. Chem. Soc. 1998. Vol. 120, № 42. P. 10947–10952.

533. Underwood C.K. et al. Palmitoylation of the C-terminal fragment of p75(NTR) regulates death signaling and is required for subsequent cleavage by gamma-secretase // Mol. Cell. Neurosci. 2008. Vol. 37, № 2. P. 346–358.
534. Murray S.S. et al. A novel p75 neurotrophin receptor-related protein, NRH2, regulates nerve growth factor binding to the TrkA receptor // J. Neurosci. 2004. Vol. 24, № 11. P. 2742–2749.
535. Wong A.W. et al. Neurotrophin receptor homolog-2 regulates nerve growth factor signaling // J. Neurochem. 2008. Vol. 106, № 4. P. 1964–1976.
536. Goncharuk M.V. et al. Bacterial synthesis, purification, and solubilization of transmembrane segments of ErbB family receptors // Mol Biol. 2011. Vol. 45, № 5. P. 823.
537. Mineev K.S. et al. Spatial structure of TLR4 transmembrane domain in bicelles provides the insight into the receptor activation mechanism // Sci Rep. 2017. Vol. 7, № 1. P. 6864.
538. Mineev K.S. et al. Characterization of Small Isotropic Bicelles with Various Compositions // Langmuir. 2016. Vol. 32, № 26. P. 6624–6637.
539. Bragin P.E. et al. HER2 Transmembrane Domain Dimerization Coupled with Self-Association of Membrane-Embedded Cytoplasmic Juxtamembrane Regions // J. Mol. Biol. 2016. Vol. 428, № 1. P. 52–61.
540. Mineev K.S. et al. NMR Dynamics of Transmembrane and Intracellular Domains of p75NTR in Lipid-Protein Nanodiscs // Biophys. J. 2015. Vol. 109, № 4. P. 772–782.
541. Nadezhdin K.D. et al. NMR structure of a full-length single-pass membrane protein NRADD // Proteins. 2019.
542. Keller R.L.J. The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial. Goldau, Switzerland: CANTINA Verlag, 2004.
543. Uhrín D. et al. 3D HCCH3-TOCSY for Resonance Assignment of Methyl-Containing Side Chains in 13C-Labeled Proteins // Journal of Magnetic Resonance. 2000. Vol. 142, № 2. P. 288–293.
544. Löhr F. et al. Improved pulse sequences for sequence specific assignment of aromatic proton resonances in proteins // J. Biomol. NMR. 2007. Vol. 37, № 3. P. 205–224.
545. Güntert P., Buchner L. Combined automated NOE assignment and structure calculation with CYANA // J Biomol NMR. 2015. Vol. 62, № 4. P. 453–471.
546. Roux-Fromy M. On the Hill plot of NMR data for titration of proteins residues // Biophys. Struct. Mech. 1982. Vol. 8, № 4. P. 289–306.
547. Laskowski R.A. et al. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR // J. Biomol. NMR. 1996. Vol. 8, № 4. P. 477–486.
548. Koradi R., Billeter M., Wüthrich K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures // J Mol Graph. 1996. Vol. 14, № 1. P. 51–55, 29–32.