

На правах рукописи

Минеев Константин Сергеевич

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

02.00.10 - биоорганическая химия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук**

Москва-2019

Работа выполнена в отделе структурной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный консультант:

доктор химических наук, профессор

Арсеньев Александр Сергеевич

Официальные оппоненты:

Финкельштейн Алексей Витальевич

доктор физико-математических наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Институт белка Российской академии наук", заведующий лабораторией физики белка

Багрянская Елена Григорьевна,

доктор физико-математических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, директор института

Аганов Альберт Варганович,

доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», заведующий кафедрой медицинской физики

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова Российской академии наук

Защита состоится 16 сентября 2020г. в 11.00 часов на заседании диссертационного Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и на сайте www.ibch.ru

Автореферат разослан ____ _____ 2020г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор физико-математических наук



Олейников В.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. 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 препаратов. С другой стороны, информация о структуре белков должна в будущем позволить оптимизировать расчётные методы предсказания их свойств, проектировать новые белки с заранее заданными характеристиками.

Несмотря на очевидную значимость, на момент начала работы данные о пространственной структуре МБ были ограниченными и разрозненными. Так, в 2005 г., в базе данных Protein Data Bank (PDB) можно было найти не более 500 структур белков, содержащих трансмембранный (ТМ) домен. При этом всего в базе содержалось около 34 000 записей, представленность в PDB класса белков, являющихся основными мишенями для разработки новых лекарств, не превышала 2%. 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, 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. В последнее время удалось получить кристаллы многих белков с использованием липидной кубической фазы, 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 структуры 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.

Научная новизна и практическая значимость работы: Несмотря на то, что фосфолипидные бицеллы используются в ЯМР-спектроскопии с середины 1980х, до последнего времени большинство работ были посвящены поведению больших бицелл, способных спонтанно ориентироваться в магнитном поле. В работе 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 рациональном 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. В работе впервые предложено использовать детергенты типа "Façade" в качестве обод-образующих агентов для малых изотропных бицелл, продемонстрированы преимущества этих соединений перед классическими детергентами в отношении белков, содержащих растворимые глобулярные домены, склонные к денатурации.

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 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 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 водорастворимый домены. Структура и динамика рецептора р75 с делецией внеклеточного домена, а также полноразмерного белка NRADD были исследованы в липид-белковых нанодисках и бицеллах. Автору удалось показать, что цитоплазматические примембранные участки длиной в 70 а.о. NRADD и р75 являются высокоподвижными и неупорядоченными и не взаимодействуют с поверхностью липидной мембраны. Показано, что движения глобулярного "домена смерти" р75 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 р75NTR, 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 на основе ЯМР-спектроскопии для изучения структуры частиц в смесях липид/детергент и определения составов, формирующих изотропные бицеллы. Показано, что в бицеллах малого размера фосфолипиды претерпевают фазовый переход между гелевым и жидкокристаллическим состояниями, что подтверждает наличие в них липидного бислоя. Показано, что липиды в бицеллах воспроизводят ряд аспектов поведения липидов в бислойных мембранах.
2. Разработана модель, описывающая форму и размер бицелл в зависимости от соотношения белок/детергент. Измерены параметры модели бицелл, сформированных различными липидами и детергентами. Показана способность наиболее распространенных типов липидов формировать бицеллы.
3. Предложены и охарактеризованы бицеллы на основе детергентов Façade-EM и Façade-EPC. Показано, что использование мягких детергентов типа Façade позволяет получать нативно свёрнутые мембранные белки, содержащие глобулярные водорастворимые домены, которые денатурируют под действием классических ободообразующих агентов.
4. Разработаны методы для детекции межмолекулярных взаимодействий в димерах трансмембранных доменов, а также для быстрого картирования интерфейсов димеризации мембранных белков на основе ЯМР-спектроскопии в растворе. Предложен метод для предсказания структуры димеров ТМД на основании изменений различных наблюдаемых параметров метильных групп при димеризации. С использованием разработанных подходов определены пространственные структуры 12 димеров ТМД.

5. Разработаны методы измерения свободной энергии и равновесной кинетики димеризации МБ в мембраноподобных средах на основе спектроскопии ЯМР. Показано, что точечные замены неполярных аминокислот на Glu, которые приводят к спонтанной активации рецепторов VEGFR2, вызывают изменение конформации димера ТМД, которому сопутствует его стабилизация. Показано, что малые изменения в липидном окружении могут оказывать значительное влияние на стабильность димера ТМД. Измерена свободная энергия димеризации 11 белков.

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

7. Исследована пространственная структура и динамика конструкции, содержащей трансмембранный и полноразмерный внутриклеточный домен рецептора нейротрофинов p75, а также полноразмерного белка с одним трансмембранным сегментом NRADD, имеющего молекулярную массу более 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. Показано, что движения домена смерти p75 никак не сцеплены с движениями трансмембранного домена белка, как в мономерной, так и в димерной форме, что противоречит общепринятому механизму активации белка.

Апробация 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 съезде 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 23 статьи в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 316 страницах и состоит из введения, обзора литературы (главы 1-2), краткой характеристики объектов исследования (глава 3), обсуждения результатов (главы 4-7), экспериментальной части (глава 8) и выводов. Работа иллюстрирована 101 рисунком и включает 11 таблиц. Библиографический указатель содержит 548 источников литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

В главе приводится описание основных методов, разработанных на настоящий момент для изучения мембранных белков с использованием спектроскопии ЯМР. 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 объекты исследования. Эта проблема является особенно актуальной при использовании ЯМР-спектроскопии высокого разрешения (в растворе). В **разделе 1.1** приводится краткая характеристика существующих мембраноподобных сред - органических растворителей, детергентных мицелл, смешанных липид/детергентных мицелл (бицелл), липид-белковых нанодисков липодисков и амфиолов, с указанием основных проблем, преимуществ и недостатков, связанных с применением данных сред.

В **разделе 1.2** приводится обзор методов продукции изотопно-меченых производных белков, особое внимание уделяется подходам, разработанным для объектов большой массы - селективному протонированию метильных групп, селективному мечению в бесклеточных системах сопряженной транскрипции/трансляции, синтезу фторированных производных, сегментному мечению.

Помимо изотопного мечения, проблемы, связанные с исследованием массивных белков, можно частично решить оптимизацией экспериментов ЯМР. За последние годы было предложено несколько новых экспериментов - импульсные последовательности TROSY, CRIPT, CRINEPT, эксперименты BEST, детекция с неоднородной выборкой точек в непрямых направлениях. Для анализа структуры дейтерированных белков предложены подходы, основанные на измерении парамагнитного усиления релаксации и остаточных констант диполь-дипольного взаимодействия. Обзор наиболее востребованных методик приводится в **разделе 1.3**.

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 том числе, необходимы методы для количественной оценки стабильности димеров ТМ доменов белков в модельных мембранах. В настоящий момент разработаны несколько подходов, в **главе 2** проводится анализ этих методик, их преимуществ и недостатков. Все подходы измеряют сигнал, который соответствует некоему среднему параметру структуры белка, что не позволяет достоверно работать со сложными равновесиями. Поэтому, предлагается рассмотреть ЯМР-спектроскопию в растворе в качестве метода измерения энергии димеризации МБ.

3. Краткая характеристика объектов исследования.

В силу ряда причин основными объектами настоящего исследования являются так называемые "Мембранные белки I типа" или битопные белки (МБ-1). Битопные белки достаточно сложно исследовать экспериментально. Их внемембранные домены обычно характеризуются большим размером и достаточно подвижны относительно ТМ сегмента. Поэтому, 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, работы, выполненные с использованием криоэлектронной микроскопии, характеризуются чрезвычайно низким разрешением (2.5-3 нм), в силу высокой конформационной гетерогенности образцов. Таким образом, ЯМР-спектроскопия высокого разрешения является 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. В первую очередь это рецепторные тирозинкиназы (РТК), являющиеся рецепторами гормонов и факторов роста. Значимость РТК обусловлена их ролью в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток, что напрямую связано с развитием онкологических заболеваний. В настоящей работе изучаются РТК семейства HER, VEGFR, Trk. Вторым классом объектов работы являются толл-подобные рецепторы (TLR). TLR - ключевые участники системы врождённого иммунитета, распознают характерные молекулы патогенов и активируют иммунные клетки. Нарушения в работе TLR могут приводить к аутоиммунным заболеваниям, TLR могут выступать мишенями для противовоспалительных препаратов. Ещё одним объектом работы является рецептор нейротрофинов р75. Данный белок принадлежит к семейству рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR) и активируется в ответ на связывание фактора роста нейронов (NGF).

Все перечисленные белки активны в виде гомо- или гетеродимеров, причём их ТМД важны для работы полноразмерного белка. На настоящий момент для рецепторов, являющихся МБ-1, предложены несколько гипотез о механизмах их активации. Наиболее широкое распространение в литературе получил механизм лиганд-индуцированной димеризации.

Согласно ему, в неактивной форме МБ-1 существует на поверхности клеток в виде мономеров, связывание лиганда вызывает взаимодействие внеклеточных доменов, димеризацию трансмембранных и активацию внутриклеточных доменов, которые запускают каскад передачи сигнала в ядро клетки. Недавно был предложен альтернативный механизм "сопряженного вращения". Согласно данной модели, в неактивном состоянии белок находится в равновесии димер-мономер, а при связывании лиганда происходит изменение конформации трансмембранных и внутриклеточных доменов в димере, что приводит к активации рецептора. Однозначно показано, что этот механизм реализуется в случае многих РТК (VEGFR, HER, FGFR), а также в случае p75NTR (который является ковалентным димером как в активном, так и в неактивном состоянии). TLR, как считается, работают по первому механизму.

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. В настоящей работе Гликофорин А используется в качестве объекта для отработки методов исследования пространственной структуры.

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

Мембраноподобная среда - важнейший элемент при исследовании пространственной структуры МБ. Среди таких сред можно отдельно выделить малые изотропные бицеллы - смешанные мицеллы липидов и детергентов особого типа. Частицы имеют дисковидную форму и, как предполагается, содержат участок липидного бислоя, при этом их размер может контролироваться изменяться в широком диапазоне от 2 нм и выше, в зависимости от соотношения липид/детергент, q . На момент начала работы, параметры фосфолипидных бицелл малого размера были изучены фрагментарно, в литературе присутствовало небольшое количество противоречивых данных, которые касаются исключительно смесей DMPC/ DHPC. Поэтому были поставлены задачи по разработке методов анализа структуры частиц бицелл и исследованию поведения различных составов.

4.1 Модель идеальной бицеллы

Существует несколько способов исследования структуры бицелл. В первую очередь это изучение размера 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". В работе для описания бицелл сформированных DHPC применялась ранее предложенная модель обода в форме эллиптического полутороида:

$$R = r + \frac{rq'}{4\lambda} \left[\pi + \sqrt{\pi^2 + \frac{32\lambda}{3q'}} \right] \quad (1),$$

где λ описывает отношение объемов молекул (детергента к липиду), R - радиус бицеллы, r - толщина обода, q' - эффективное соотношение липид/детергент с поправкой на концентрацию "свободного" детергента в растворе (Рис. 1). В то же время для описания частиц, сформированных плоскими амфифилами - CHAPS, CHAPSO и др, была разработана модель с цилиндрической формой обода:

$$R = r \left[1 + \frac{q'}{\lambda} + \frac{\sqrt{q'(q'+\lambda)}}{\lambda} \right] \quad (2).$$

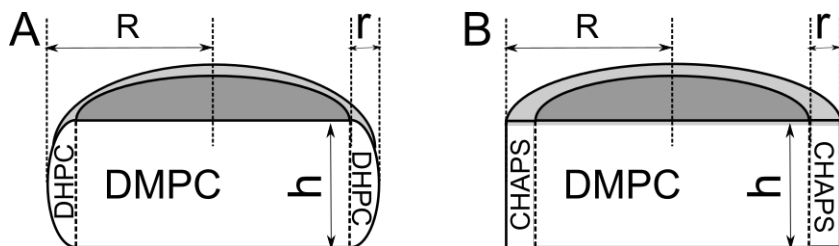


Рисунок 1. Модели идеальной бицеллы. **А** - модель с ободом в виде эллиптического полутороида. **В** - модель с цилиндрическим ободом, предлагаемая для бицелл DMPC/CHAPS.

4.2. Разработка методики измерения размера бицелл.

Имея выражения (1) и (2), необходимо провести достоверные измерения зависимости размера частиц от соотношения q . В литературе можно встретить несколько попыток измерения размера бицелл при помощи малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН), динамического светорассеяния (ДСР) и ЯМР, все исследования приводят различные значения радиусов. Таким образом, встаёт задача разработки надежной методики для измерения радиуса частиц и концентрации свободного детергента. Методика должна быть применима в широком диапазоне температур и концентраций компонентов смеси. Предлагается использовать спектроскопию ЯМР и подходы на основе импульсных градиентов магнитного поля. Соответственно, первой задачей работы была разработка метода достоверного измерения коэффициентов диффузии и их преобразования в радиусы частиц дисковидной формы.

При измерении диффузии методом ЯМР можно получить две величины: коэффициенты диффузии липида и детергента, D_{lip} и D_{det} , которые связаны между собой соотношением:

$$D_{det} = \alpha D_f + (1 - \alpha) D_{lip} \quad (3),$$

где α - доля молекул детергента в свободном состоянии, а D_f - коэффициент диффузии мономера детергента, который можно измерить отдельно. Из соотношения (3) можно вычислить концентрацию детергента в мономерной форме $[Det]_{free}$ и эффективное соотношение q' , которое определяет размер бицелл. Затем предлагается совершить три преобразования, используя теоретические зависимости. (1) Рассчитать коэффициент диффузии бицелл при бесконечном разбавлении D_0 с учетом объемной доли бицелл в растворе. (2) Вычислить гидродинамический радиус эквивалентной сферы, используя соотношение Стокса-Эйнштейна, и (3) рассчитать радиус бицелл, используя форм-фактор для диффузии дисков и цилиндров. Для апробации предложенной методики были измерены размеры нанодисков (ЛБН). Полученный из коэффициентов диффузии радиус ЛБН MSP1D1/DMPC составил 4.9 ± 0.1 нм и не менялся в диапазоне температур 27-40 °С. Величина согласуется с результатами других исследований: 4.7-5.1 нм, по данным четырех разных методов. Для ЛБН MSP1ΔH5/DMPC радиус составил 4.1 ± 0.1 нм, что также подтверждается литературой. Таким образом, разработанная методика позволяет получать воспроизводимые результаты для дисковидных частиц при различных температурах, данные согласуются с независимыми измерениями при помощи других физических методов.

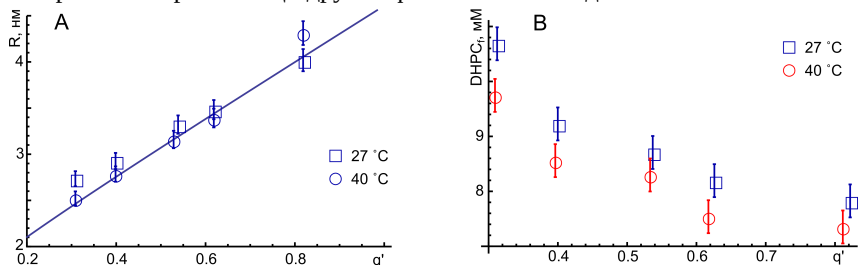


Рисунок 2. А - зависимость $R(q')$ бицелл DMPC/DHPC при 27 (квадраты) и 40 °С (круги). Линией показана теоретическая зависимость в соответствии с моделью идеальной бицеллы (уравнение (1)). В - концентрация мономерного DHPc в растворах бицелл DMPC/DHPC.

На следующем этапе были изучены бицеллы DMPC/DHPC $q=0.5$, так как для этих частиц можно найти большое количество литературных данных. Использование методики позволило получить следующие параметры: $D_0 = 111 \pm 1 \times 10^{-12} \text{ м}^2 \text{ с}^{-1}$, $R = 3.1 \pm 0.1$ нм при $q=0.53$ и 40 °С. По измерениям методом ДСР, радиус бицелл $q=0.5$ лежит в диапазоне 2.9-3.3 нм, в зависимости от общей концентрации частиц, что согласуется с указанными значениями. Наконец, для окончательной проверки методики была проведена серия экспериментов по измерению радиусов бицелл DMPC/DHPC с различными значениями q в диапазоне от 0.31 до 0.82. Полученные зависимости $R(q)$ следуют модели идеальной бицеллы (1) с

толщиной обода 1.15 нм и соотношением объёмов детергента и липида равным 0.6, что соответствует теоретическим предположениям (Рис. 2А). Предложенная методика позволяет напрямую измерять как размер бицелл, так и $[Det]_{free}$. Концентрация ДНРС в растворе зависит и от температуры, и от соотношения q (Рис. 2В). Измеренные значения $[Det]_{free}$ оказываются выше, чем полученные ранее из химических сдвигов ^{31}P . Анализ постановки экспериментов позволяет утверждать, что концентрация мономерного детергента, измеренная в данной работе, является более точной и должна соответствовать действительности. Как будет показано ниже, $[Det]_{free}$ является чрезвычайно важным параметром бицелл, поскольку знание его величины позволяет контролировать размер частиц при низких концентрациях липидов.

4.3. Параметры бицелл на основе CHAPS.

Методика была в первую очередь использована для изучения бицелл на основе плоских амфифилов. Плоские амфифилы являются гораздо более мягкими детергентами, чем ДНРС, что может быть важным фактором при исследовании крупных фрагментов МБ, содержащих водорастворимые домены. Тем не менее, до начала работы в литературе полностью отсутствовала информация о размерах и структуре малых бицелл на основе CHAPS или его аналога CHAPSO. Наблюдаются некоторые отличия бицелл DMPC/CHAPS от частиц DMPC/ДНРС (Рис. 3). В первую очередь, CHAPS формирует бицеллы, которые значительно меньше, чем частицы, образованные ДНРС при равных соотношениях q . Анализ кривых $R(q)$ показал, что размер бицелл DMPC/CHAPS согласуется с моделью (2) при $q < 1.1$. Параметры модели идеальной бицеллы оказываются следующими: $r = 1.2 \pm 0.06$ нм, $\lambda = 1.73 \pm 0.2$, что соответствует теоретическим предположениям.

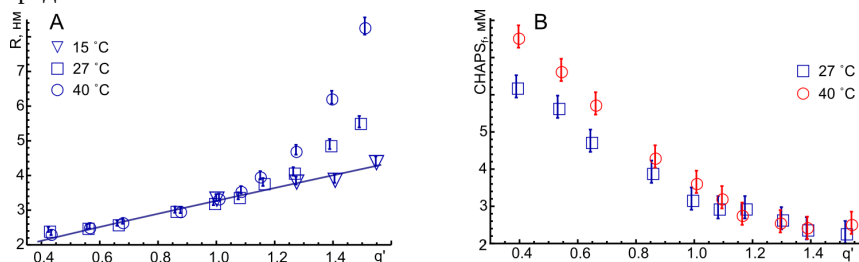


Рисунок 3. А - зависимость $R(q)$ бицелл DMPC/CHAPS при 15 (треугольники), 27 (квадраты) и 40 °C (круги). Линией показана теоретическая зависимость в соответствии с моделью идеальной бицеллы (уравнение (2)). В - концентрация мономерного CHAPS в растворах бицелл DMPC/CHAPS.

При $q > 1.1$ бицеллы становятся больше, чем ожидается, их размер начинает зависеть от температуры. При этом, ниже точки 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). Отметим, что феномен ТЗР нельзя объяснить фазовым переходом между жидкокристаллическим (ж.к.) и гелевым состояниями липидов бицелл. 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.

4.4 Параметры бицелл на основе CHAPSO и холиевой кислоты.

Большинство работ в области анизотропных бицелл (большие частицы, которые могут спонтанно ориентироваться в магнитном поле) опирается на использование CHAPSO в качестве обод-образующего детергента. 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. Зависимость $R(q)$ близки, бицеллы с $q > 1.1$ также увеличиваются при нагреве, концентрации детергента в растворе не различались. Очевидно, что с точки зрения применения для нужд ЯМР высокого разрешения в малых бицеллах эти два детергента эквивалентны. Поскольку стоимость CHAPS в 4 раза ниже, предлагается в дальнейшем рассматривать бицеллы только на основе данного детергента.

Другим популярным плоским амфифилом является холиевая кислота. Этот детергент дешев и именно он использовался в первых работах, связанных с бицеллами, как классом мембраноподобных сред. Как оказалось, бицеллы DMPC/Холат не согласуются с моделью (2). 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.

4.5 Параметры бицелл на основе детергентов Façade.

Даже такой детергент, как CHAPS, может негативно влиять на активность белков, как мембранных, так и растворимых, в то время как DHPC может денатурировать растворимые домены МБ. Поэтому, предлагается разработать новые обод-формирующие агенты для бицелл, более "мягкие" в отношении растворимых доменов МБ. Как оказалось, подходящие детергенты были предложены для кристаллизации мембранных белков и получили название общее название Façade. Детергенты Façade являются производными холиевой кислоты, как CHAPS и CHAPSO. Авторы предложили модифицировать полярную поверхность холата по гидроксильным группам либо остатками углеводов (глюкозы и мальтозы), либо фосфохолина, с целью сделать молекулы детергентов более амфифильными и понизить ККМ (Рис. 4). Сообщается, что два детергента - Façade-EM и Façade-EPC способны растворять липидные везикулы даже при соотношениях липид/детергент 10:1. Поэтому, можно предположить, что Façade окажутся превосходными обод-образующими агентами для

бицелл. Для проверки гипотезы была изучена зависимость размера бицелл DMPC/Ғаҗаде-ЕМ и DMPC/Ғаҗаде-ЕРС от q и температуры.

Анализ смесей DMPC/Ғаҗаде-ЕМ, показывает, что Ғаҗаде-ЕМ ведёт себя схожим образом с СНАРС. Аппроксимация зависимостей $R(q)$ уравнением (2) позволяет получить следующие параметры: $r=1.7\pm 0.1$ нм, $\lambda=3.1\pm 0.4$. Таким образом, обод из Ғаҗаде-ЕМ оказывается на 0.5 нм толще, чем обод из СНАРС, а объем детергента возрастает в 1.8 раз, что полностью согласуется с параметрами молекул. Другая картина наблюдается при изучении смеси DMPC/Ғаҗаде-ЕРС. Частицы оказываются существенно меньше бицелл СНАРС при тех же q . Аппроксимация зависимости $R(q)$ при 27 °С позволяет получить параметры $r=1.24\pm 0.03$ нм, $\lambda=2.4\pm 0.1$, что согласуется с размером молекул Ғаҗаде-ЕРС. С другой стороны, при 15 °С получены параметры $r=1.6\pm 0.1$ нм, $\lambda=3.9\pm 0.4$, то есть при температурах ниже точки фазового перехода DMPC бицеллы на основе Ғаҗаде-ЕРС образуются с гораздо более плотной упаковкой липидов и/или менее плотной упаковкой детергента в ободе, чем выше критической точки. Это можно интерпретировать как индикатор фазового перехода липидного бислоя. Также стоит отметить и особое поведение бицелл DMPC/Ғаҗаде-ЕРС при изменении температуры. Эффект ТЗР наблюдается только для очень больших частиц ($R>5$ нм), с $q\sim 3$ и достаточно слабо выражен.

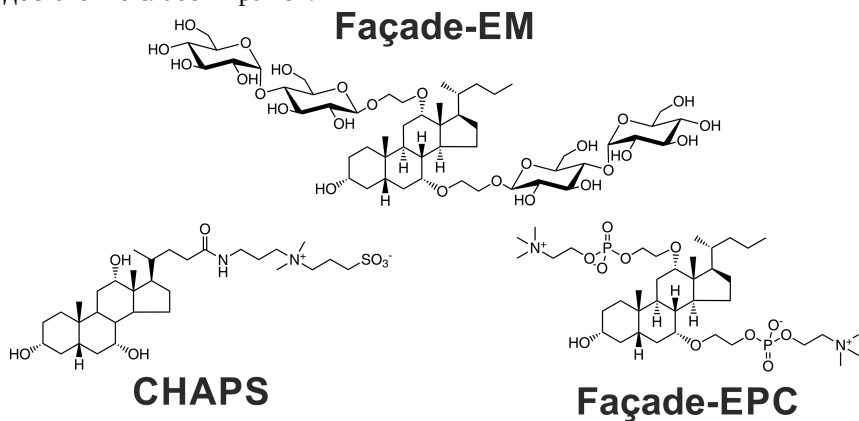


Рисунок 4. Сравнение структуры СНАРС и структур двух детергентов Ғаҗаде.

Можно заключить, что было впервые предложено использовать детергенты типа Ғаҗаде для приготовления малых изотропных бицелл. Такие бицеллы действительно образуются и характеризуются повышенной стабильностью при высоких температурах.

4.6. Параметры бицелл на основе ДН₇РС.

Дигептаноилфосфатидилхолин (ДН₇РС) чрезвычайно похож на ДНРС, отличаясь всего на одно звено в ацильной цепи. Из-за этого ДН₇РС неоднократно применялся в смеси с липидами для солубилизации МБ. Как

оказалось, поведение бицелл DH_7PC кардинально отличается от классических частиц на основе DHPC . При 40°C частицы подвержены сильнейшему ТЗР. С другой стороны, при 20°C , частицы оказываются относительно небольшими, однако зависимость $R(q)$ искажена: при q свыше 0.6 частицы начинают уменьшаться с увеличением q , что в корне противоречит всем возможным моделям идеальной бицеллы (Рис. 5). В диапазоне q 0.2-0.6 зависимость можно описать моделью (1), при этом получаются параметры $\lambda=1.61\pm 0.14$ и $r=2.0\pm 0.05$ нм. Опираясь на структуру молекулы DH_7PC можно ожидать $\lambda=0.65$ и $r=1.34$ нм, иными словами, зависимость $R(q)$ для бицелл $\text{DMPC}/\text{DH}_7\text{PC}$ не соответствует модели идеальной бицеллы.

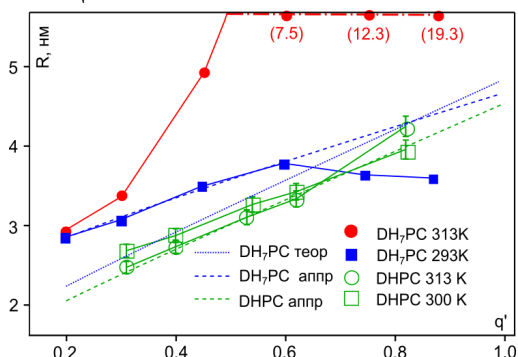


Рисунок 5. Зависимость $R(q')$ в смесях $\text{DMPC}/\text{DH}_7\text{PC}$ и DMPC/DHPC . Зелёная пунктирная линия соответствует предсказанной форме бицеллы для смесей DMPC/DHPC (уравнение (1)). Синей пунктирной линией показан аналогичный график для смеси $\text{DMPC}/\text{DH}_7\text{PC}$. Синей прерывистой линией обозначен результат аппроксимации уравнением (1) зависимости $R(q')$ для частиц $\text{DMPC}/\text{DH}_7\text{PC}$ в диапазоне q 0.2-0.6 при 20°C .

Полученные данные ярко показывают важность исследования структуры частиц в смесях липидов и детергентов перед их применением в качестве мембраноподобной среды. Даже самые незначительные различия в структуре детергентов могут привести к существенному изменению в поведении частиц, сформированных с их участием. С другой стороны, на примере DH_7PC видно, что изучение зависимости $R(q)$ может выявить смеси, которые характеризуются неидеальным поведением. Иными словами, зависимость $R(q)$ может служить критерием "идеальности" бицелл, корректности формирования частиц в растворе.

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

Помимо типа ободообразующего агента липидный состав также может являться важнейшим фактором, влияющим на характеристики бицелл. Поэтому, были изучены размеры бицелл на основе четырёх различных липидов и CHAPS : DLPC , DMPC , DPPC , POPC . Как оказалось, все четыре

смеси демонстрируют схожее поведение. 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. Следует отметить, что объем молекулы липида коррелирует с коэффициентом λ (Рис. 6). Если обобщить все данные, полученные в работе при помощи модели (2) 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 2.27. Наличие этих корреляций является важным косвенным свидетельством в пользу предложенной модели идеальной бицеллы для плоских амфифилов.

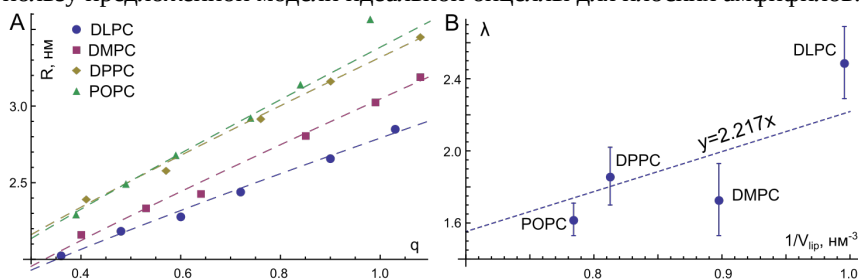


Рисунок 6. А - зависимости $R(q)$, измеренные при 20 °С для бицелл DLPC/CHAPS, DMPC/CHAPS, DPPC/CHAPS и POPC/CHAPS. Линиями показан результат аппроксимации экспериментальных точек моделью идеальной бицеллы (2). В - коэффициент λ уравнения (2) для бицелл из различных липидов отобразён как функция обратного объёма молекулы липида в бислое. Линией показан результат аппроксимации точек линейной зависимостью типа $y=kx$.

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

Описанные выше эксперименты показывают, что методика для измерения размера 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.

Было показано, что при разбавлении бицеллы начинают расти и в конце концов превращаются в перфорированные бислои, из-за того, что часть детергента всегда находится в растворе, и при низких концентрациях эффективное соотношение q' , которое определяет размер бицелл согласно моделям (1) и (2), начинает слишком сильно отличаться от номинального. По ряду причин, ограничение снизу концентрации бицелл является нежелательным при проведении структурных исследований. Поэтому, предлагается применить на практике информацию о концентрации детергентов в растворе для создания методики приготовления бицелл контролируемого размера в низких концентрациях. Процесс формирования бицелл схож с мицеллообразованием, поэтому, можно ожидать, что

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, можно рассчитывать получить смесь с заданным соотношением q' . Эта гипотеза была проверена на трех составах бицелл - DMPC/DHPC $q=0.5$ и DMPC/CHAPS $q=0.5$ и 1.0 . 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 $[\text{Det}]_{\text{free}}$ при заданных q' . Размер и соотношение q' сохранялось при разбавлении раствором детергента, в то время как частицы увеличивались при разбавлении водой (Рис. 7).

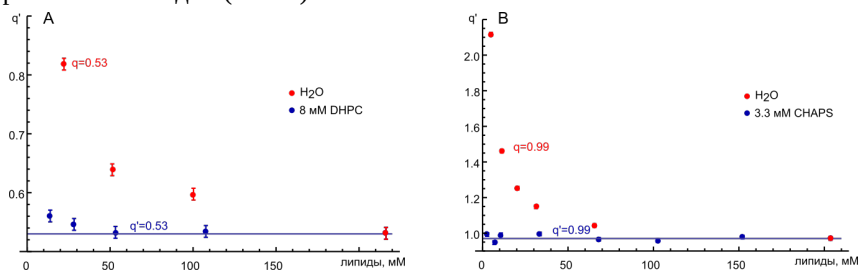


Рисунок 7. зависимость эффективного соотношения q' от концентрации липидов в бицеллах для смесей DMPC/DHPC $q=0.53$ (A) и DMPC/CHAPS $q=0.99$ (B), полученных разбавлением начального образца водой (красные точки) или раствором $[\text{Det}]_{\text{free}}$ (синие точки). Прямые показывают значение $q=0.53$ и $q=0.99$. Все эксперименты проводились при 40 °С.

4.9. Характеристики бицелл со встроенным ТМ белком.

До сих пор обсуждалась только структура "пустых" бицелл, бицеллы в присутствии белка могут формироваться по другому принципу. Поэтому, размер бицелл был исследован в присутствии модельного белка, ТМ домена рецепторной киназы TrkA (TrkAtm). Для определения размера бицелл с TrkAtm был предложен подход на основе измерения вращательной диффузии белка из скорости кросс-скорелированной релаксации амидных групп. Из скорости вращательной диффузии определялся радиус эквивалентной сферы, а затем и радиус бицеллы. Для анализа полученных данных была создана модель идеальной бицеллы с белком, которую можно легко получить, решив уравнение для соответствующей формы обода:

$$q' = \frac{V_{\text{disc}} - S_{\text{prot}} h}{V_{\text{rim}}} \lambda \quad (4)$$

где V_{disc} и V_{rim} - объемы обода и диска, h - толщина бислоя, S_{prot} - площадь, занимаемая белком в липидном бислое (1.5 нм² для единичной α -спирали).

^2H - ^{15}N -меченый TrkAtm был встроен в бицеллы DMPC/DHPC и DMPC/CHAPS, после чего было проведено измерение зависимости $R(q)$. Частицы DMPC/CHAPS ведут себя в соответствии с предсказанием (уравнение (4) с параметрами λ и γ , соответствующими "пустым" бицеллам) в диапазоне q 0.7-1.0. В случае DMPC/DHPC радиусы бицелл с белком и без него одинаковы при $q=0.3-0.4$, в то время, как при $q>0.5$, радиус бицелл с TrkAtm оказывается всегда ниже, чем радиус "пустых" частиц. Это объяснимо, если предположить, что белок может не двигаться монолитно вместе с бицеллой, а иметь дополнительную подвижность в нс диапазоне (Рис. 8А).

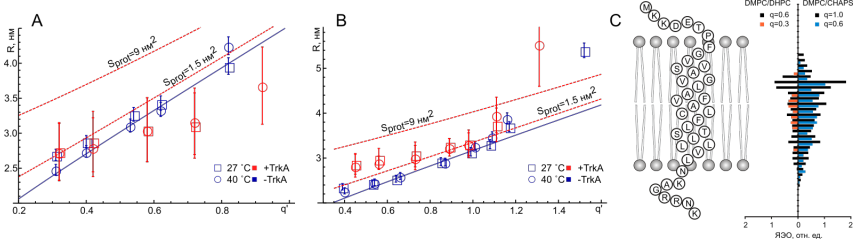


Рисунок 8 А, В - зависимость радиуса бицелл от q смеси DMPC/DHPC (А) и DMPC/CHAPS (В) в присутствии TrkAtm (показаны красным) и в отсутствие белка (синим), при 27 (квадраты) и 40 (круги) °С. Прерывистые красные линии соответствуют решению уравнения (4) с параметрами $S_{\text{prot}} = 1.5$ (одна ТМ спираль) и 9 (6 спиралей) nm^2 . Синими линиями показаны зависимости $R(q)$ для идеальных бицелл. **С** - интенсивность кросс-пиков ЯЭО между амидными протонами TrkAtm и CH_2 -группами липидов (1.25 м.д.), наблюдаемых в спектрах $3\text{D-}^1\text{H}, ^{15}\text{N-NOESY-HSQC}$ $^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -меченого белка, встроенного в бицеллы DMPC/CHAPS ($q=0.6$ и $q=1.0$) и DMPC/DHPC ($q=0.3$ и $q=0.6$).

Очевидно, что ТМ домен может выступать сенсором параметров упаковки липидов и детергентов в бицелле. Поэтому, были проанализированы спектры $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -TROSY TrkAtm в частицах DMPC/DHPC и DMPC/CHAPS. Положения сигналов белка практически не отличаются в двух средах, изменения незначительны и наблюдаются в основном на концах α -спиралей, вторичная структура TrkAtm не зависит от выбора обод-образующего агента. Для двух образцов с одинаковой вращательной диффузией белка был проведён анализ медленных движений. В обоих случаях, на С-концах ТМ спиралей наблюдались одинаковые интенсивности сигналов, было обнаружено существенное уширение линий кросс-пиков остатков в первых двух витках α -спирали, при этом эффект был выражен гораздо сильнее в случае бицелл DMPC/DHPC. Таким образом, можно заключить, что в бицеллах DMPC/DHPC белок 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. Изменения химических

сдвигов из-за вариации размера бицелл являются незначительными и происходят в основном на краях α -спиралей, картины изменений очень схожи в бицеллах DMPC/DHPC и DMPC/CHAPS.

Чтобы изучить взаимодействия белок/липид, были получены спектры 3D ^1H , ^{15}N -NOESY-HSQC образцов ^2H , ^{15}N -TrkA в бицеллах DMPC/DHPC и DMPC/CHAPS, в которых были измерены интенсивности межмолекулярных кросс-пиков липид/белок. Во всех образцах были обнаружены сигналы исключительно на CH_2 группы (1.25 м.д.) и на концевые метильные группы (0.86 м.д.) ацильных цепей липидов. То есть, содержание детергента в непосредственном окружении ТМ домена мало, смешивание между липидом и детергентом не наблюдается. Независимо от соотношения q' , в бицеллах на основе DHPC величина Ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) белок/липид в два раза ниже, чем в бицеллах на основе CHAPS (Рис. 8С). Иными словами, в бицеллах DMPC/DHPC липиды оказываются более подвижными, чем в бицеллах DMPC/CHAPS.

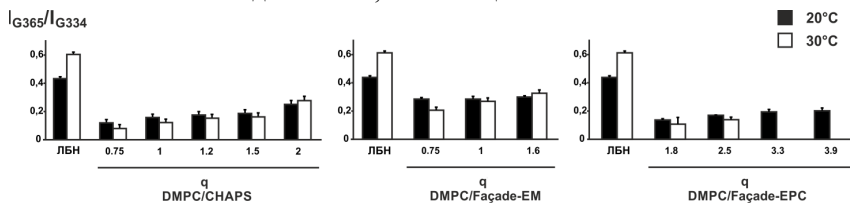


Рисунок 9. Качество спектров ЯМР ДС р75 в составе белка р75- Δ ECD в различных типах бицелл на основе плоских амфифилов при 20 и 30 °C. Как критерий качества выступает отношение интенсивностей сигнала от амидной группы G365 к интенсивности сигнала от остатка линкерного участка (G334).

Помимо процессов, происходящих внутри липидной мембраны, важно, чтобы водорастворимые домены белков также сохраняли свою функциональность в составе частиц мембраноподобных сред. В представленной работе проводилось исследование конструкции, содержащей ТМ домен и внутриклеточный домен рецептора р75NTR (р75- Δ ECD, остатки 236-427) в различных мембраноподобных средах (мицеллы, бицеллы DMPC/DHPC, ЛБН). Как оказалось, нативная структура домена сохраняется только в ЛБН. Дальнейший анализ показал, что в бицеллах DMPC/CHAPS в котором структура внутриклеточного домена смерти р75 (р75-ДС) является нативной, однако, интенсивность сигналов от домена ослаблена из-за взаимодействия с ободом частиц. ЛБН является приемлемой средой для исследования структуры, однако, ряд аспектов поведения белка можно изучить только в бицеллах/мицеллах. Поэтому, были рассмотрены бицеллы на основе детергентов Façade-EM и Façade-EPC. Оказалось, что Façade-EM сохраняет нативно свернутое и растворимое состояние ДС р75 в широком диапазоне соотношений q . С другой стороны, применение Façade-EPC не приносит никакого выигрыша по сравнению с CHAPS, скорее наоборот (Рис. 9).

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 моделям, при этом параметры частиц соответствуют предположениям, сделанным на основе структуры молекул липидов и детергентов. Использование ТМ белка 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 DPPC и CHAPS при определённых условиях окружающей среды можно считать практически доказанным фактом. Остаётся вопрос, насколько хорошо частицы изотропных бицелл малого размера воспроизводят свойства бислойных мембран. Одним из способов решения проблемы является изучение фазового поведения липидов в бицеллах. Химический сдвиг фосфора чрезвычайно чувствителен 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. Поэтому, было предпринято систематическое исследование бицелл различного состава, с использованием спектроскопии ЯМР ^{31}P . При высоких температурах в спектрах ^{31}P бицелл DPPC/CHAPS $q=1.5$ наблюдается единственный узкий пик при -0.8 м.д. (Рис. 10). При этом ниже 37°C , сигнал DPPC оказывается расщеплён на две компоненты, узкую и широкую, сдвинутую в область слабого поля. Заселённости двух компонент зависят от температуры. Полученные данные позволяют заключить, что при помощи ^{31}P -ЯМР можно наблюдать фазовые переходы в малых изотропных бицеллах, и фазовый переход в изотропных бицеллах является "фракционным". Анализ коэффициентов диффузии пиков в спектрах ^{31}P 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 гелевые частицы характеризуются большим размером, что объясняется различной энергией детергента в ободе бицелл двух типов.

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

Чтобы понять, как выглядят малые изотропные бицеллы, необходимо изучить зависимость параметров фазовых переходов липидов от размера частиц. Для этой цели были приготовлены несколько образцов бицелл DPPC/CHAPS с q' в диапазоне 0.6-1.5 (Рис. 10). Эксперимент показал, что фазовые переходы происходят даже в самых малых частицах, которые можно использовать для нужд ЯМР-спектроскопии в растворе. Доля частиц с гелевым состоянием липидов уменьшается с соотношением q' .

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 °C при $q'=1.5$ до 17 °C при $q'=0.6$, при том что критическая температура DPPC в бислое составляет 41 °C. Регистрация фазовых разрешает длительный спор о структуре изотропных бицелл. Становится очевидно, что участок липидного бислоя присутствует даже в самых малых частицах, которые способны воспроизводить одно из основных свойств липидных мембран - фазовые переходы из гелевого состояния в ж.-к.

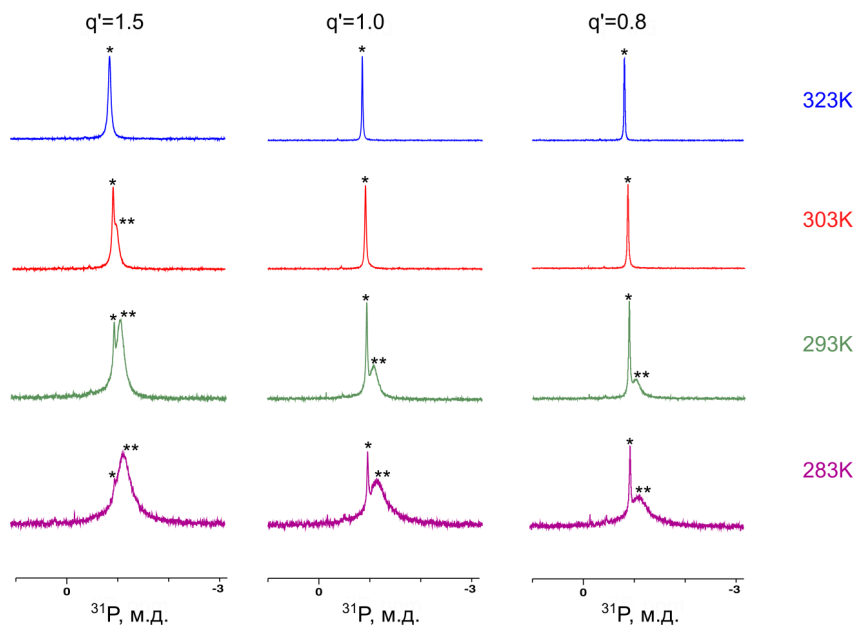


Рисунок 10. Спектры ЯМР ^{31}P полученные при температурах от 10 (283 K) до 50 (323 K) °C для изотропных бицелл DPPC/CHAPS с q' равным 1.5, 1.0 и 0.8. Сигналы от ж.-к. и гелевого состояния липидов отмечены * и **, соответственно.

Общий характер сделанных выводов и применимость подхода необходимо проверить на бицеллах, содержащих другие липиды и обод-образующие агенты. В первую очередь было изучено влияние свойств ацильных цепей липидов на фазовые переходы. Фазовый переход не наблюдался в бицеллах POPC/CHAPS, что предсказуемо, поскольку POPC характеризуется критической температурой ниже 0 °C. DMPC вёл себя аналогично DPPC: два сигнала ^{31}P наблюдались в спектрах ЯМР ниже 20 °C в то время как критическая температура DMPC равна 24 °C в бислое. Как и для DPPC, эффективная критическая температура фазовых переходов снижается при малых q' : с 17 °C при $q'=1.5$ до 8 °C при $q'=1$. Таким образом, параметры 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 (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.

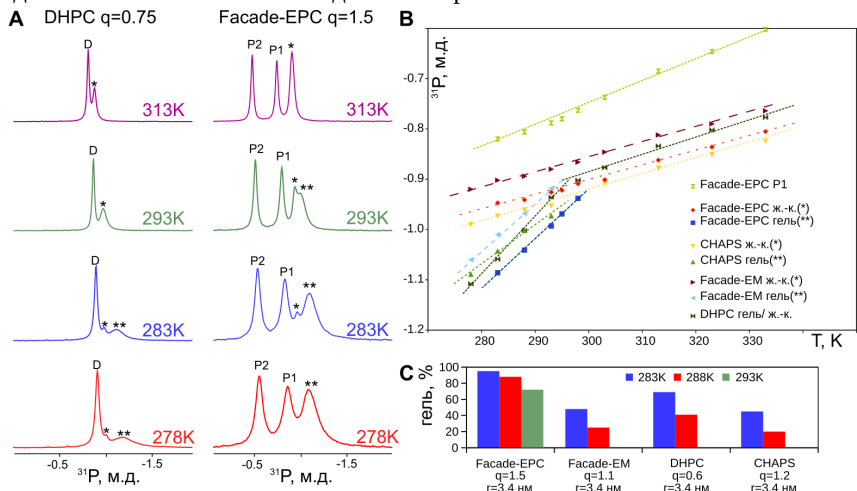


Рисунок 11. **А** - спектры ^{31}P бицелл DMPC/DHPC $q=0.75$ и DMPC/Façade-EPC $q=1.5$, полученные при различных температурах. D обозначает положение пика от DHPC, P1 и P2 - положения пиков фосфатных групп Façade-EPC, а * и ** - положения сигналов от ж.-к. и гелевой формы DMPC. **В** - зависимость химических 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. **С** - 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.

Другим важным вопросом является влияние обода бицелл на параметры фазовых переходов (Рис. 11А). Фазовые переходы были изучены в бицеллах на основе DMPC для 4 детергентов помимо CHAPS - Façade-EM, Façade-EPC, DHPC и DH₇PC. В случае DHPC, Façade-EM и Façade-EPC поведение смесей было схожим с бицеллами, образованными CHAPS. Интересно, что для всех четырех детергентов фазовые переходы обнаружены даже в самых малых частицах, которые можно применять для нужд 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). Анализ спектров ^{31}P смесей DMPC/DH₇PC показывают, что частицы способны испытывать фазовый переход, однако, при температурах выше

20 °С пики от липида и детергента уширяются и сливаются друг с другом, что может свидетельствовать о смешивании липидов и детергентов. 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 фосфолипидов, формирующего участок липидного бислоя.

Сравнивая содержание липида в гелевой фазе в бицеллах на основе различных детергентов схожего размера (3.4 нм), можно увидеть, что состав обода частицы влияет на эффективную критическую температуру. Наилучшие результаты демонстрируют Façade-EPС и DHPC - детергенты, которые характеризуются меньшей амплитудой температурно-зависимого роста частиц. Для бицелл DMPC/Façade-EPС T_c оказывается не ниже критической температуры DMPC в бислое - уже при 20 °С большая часть липида оказывается в гелевом состоянии (Рис. 11С).

Методику можно применить и для детекции фазовых переходов в ЛБН. В нанодисках не наблюдались фракционные фазовые переходы - во всем диапазоне температур в спектре присутствовал один пик. При этом на кривой зависимости химического сдвига ^{31}P от температуры наблюдался излом в районе 25 °С. Выше 25 °С сигнал ЛБН ведет себя так же, как и сигнал от ж.-к. бицелл, в то время как ниже 25 °С увеличивается температурный коэффициент, поведение пика становится похожим на поведение гелевых бицелл. Для сравнения ЛБН с бицеллами схожего размера были получены смеси DMPC/DHPC $q=1$ (5.1 нм), DMPC/Façade-EPС $q=3$ (4.9 нм) и DMPC/Façade-EM $q=3$ (5.7 нм). Спектры ^{31}P ЛБН идеально совпадают со спектром DMPC в составе бицелл и по положению сигнала и по его ширине. 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 частицах. Если рассматривать ЛБН в качестве "стандарта" мембраноподобной среды, содержащей фрагмент липидного бислоя, можно сказать, что бицеллы данному стандарту удовлетворяют в полном объеме.

Дополнительно было обнаружено, что концентрация частиц влияет как на параметры фазовых переходов, так и на амплитуду эффекта ТЗР. При разбавлении фазовые переходы становятся более выраженными, диапазон сосуществования фаз уменьшается, ТЗР значительно ослабляется.

4.12. Причины возникновения температурно-зависимого роста бицелл

Анализ всех данных, накопленных в результате работы (зависимость от концентрации и типа липида, связь с фазовыми переходами и пр.) позволяет заключить, что эффект ТЗР связан с обратимым слиплением частиц при соударении. Повышение концентрации смещает равновесие в

сторону "слитых" бицелл, что приводит к увеличению радиуса частиц при высоких концентрациях. 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 обод-образующих агентов

Данные полученные в главе 4 можно использовать для сравнения различных обод-образующих соединений. Оказалось, SNAPS является наиболее предпочтительным детергентом с точки зрения соотношения цена/качество - он достаточно "мягок" и не денатурирует белки, формирует стабильные бицеллы с плотной упаковкой липидов и чрезвычайно дешёв. Иными словами, для "стандартного" исследования структуры МБ, следует выбирать SNAPS 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-EPС неясны.

4.14. Критерии корректности формирования бицелл.

В данной работе приводится информация о свойствах ряда смесей липидов и детергентов, которые наиболее часто применяются для изучения пространственных структур мембранных белков, в качестве липида опробованы несколько фосфатидилхолинов. Однако, структура в единственном окружении не всегда предоставляет достаточное количество информации для понимания принципов работы МБ в силу мозаичности структуры клеточной мембраны. Поэтому, желательно иметь возможность готовить изотропные бицеллы, содержащие анионные липиды, сфингомиелин, фосфатидилэтаноламин, холестерин, ганглиозиды и другие важнейшие компоненты клеточных мембран.

Для анализа возможности приготовления таких бицелл были сформулированы два критерия "правильности" структуры частиц в растворе: **Смесь липид/детергент образует бицеллы в том случае, если зависимость $R(q)$ можно аппроксимировать моделью идеальной бицеллы с разумными параметрами, а также если липиды в таких частицах претерпевают фазовый переход.**

4.15. Поведение изотропных бицелл из наиболее распространённых липидов.

Указанные критерии были применены для изучения бицелл, образованных наиболее распространёнными типами липидов. В частности были получены смеси с включение фосфатидилэтаноламина (ФЭ), сфингомиелина (СМ), холестерина, фосфатидилглицерина (ФГ) и фосфатидилсерина (ФС). Удалось показать, что ФЭ, в силу особенностей своей структуры, не подходит для приготовления бицелл, как по

отдельности, так и в смесях с другими фосфолипидами. Добавление ФЭ сопровождается образованием осадка. При этом, бицеллы из СМ образуются корректно (Рис. 12), однако, попытки смешивания СМ с холестерином для имитации рафтов клеточной мембраны, приводят к получению полидисперсных растворов с частицами большого размера. Анионные липиды в чистом виде не образуют бицеллы, однако в смеси с цвиттерионными липидами могут объединяться в частицы необходимой формы. Интересно, что такие смешанные бицеллы имитируют ряд аспектов поведения бислоев схожего состава - воспроизводят зависимость критической температуры от соотношения компонентов, а также изменения критической температуры в ответ на добавления одно- и двухзарядных катионов металлов. Холестерин можно добавлять в бицеллы в количестве не более 10% от количества липидов, при этом образцы оказываются нестабильными и требуют чрезвычайно осторожного обращения. Добавление холестерина приводит к уменьшению эффекта ТЗР, что может свидетельствовать об увеличении плотности упаковки бислоя.

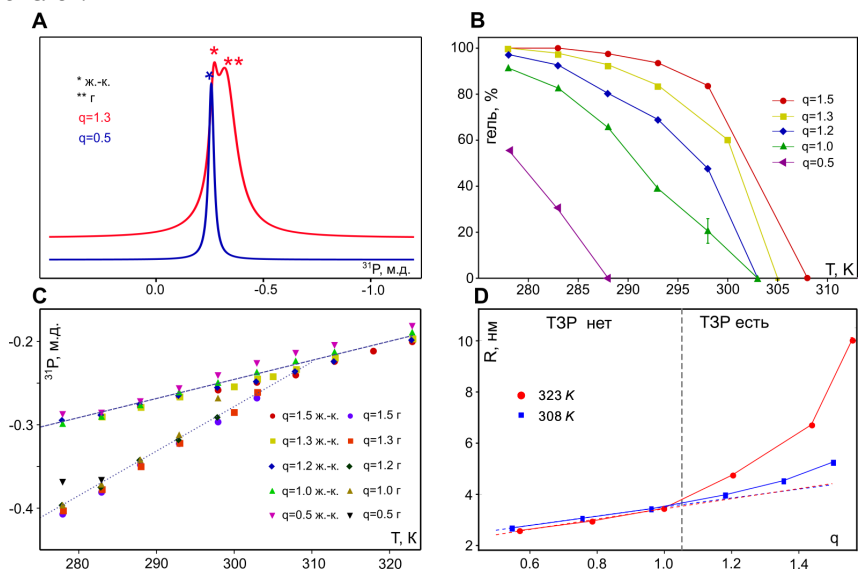


Рисунок 12. **А** - суперпозиция спектров ^{31}P ЯМР бицелл СМ/СНАРС $q=1.3$ (красным) и $q=0.5$ (синим) при 20 °С. Пики отмеченные * и ** соответствуют СМ в ж.-к. и гелевой фазе, соответственно. **В** - доля СМ в гелевом состоянии в бицеллах СМ/СНАРС при различных соотношениях q и температурах. **С** - зависимость химических сдвигов ^{31}P СМ в бицеллах СМ/СНАРС $q=0.5-1.5$ от температуры в гелевом и ж.-к. состояниях. **Д** - зависимости $R(q)$, измеренные для бицелл СМ/СНАРС при 35 (синие точки) и 50 (красные точки) °С. Пунктирными линиями показан результат аппроксимации точек, для которых не наблюдается ТЗР, моделью идеальной бицеллы (8).

Таким образом, был разработан исчерпывающий набор методов для анализа структуры бицелл произвольного состава. Предложены теоретические модели бицелл, которые подтверждаются экспериментальными данными. Доказано наличие в частицах фрагмента липидного бислоя и показана способность бицелл воспроизводить значимые аспекты поведения мембран. Разработанные методики были применены для создания практического полного справочника по поведению бицелл различного состава в зависимости от температуры и концентрации компонентов смесей. 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.

5. Разработка методов определения структуры димеров мембранных белков.

5.1. Изотопная фильтрация

Основными проблемами при изучении структуры олигомеров МБ с использованием спектроскопии ЯМР являются (1) определение олигомерной формы белка в образце и (2) измерение межмолекулярных взаимодействий. При образовании симметричных димеров/олигомеров, химические сдвиги ядер различных субъединиц комплекса оказываются неотличимы в силу их эквивалентности. Ранее существовавшие методы определения структуры димеров МБ связаны с достаточно субъективной процедурой выявления межмолекулярных контактов. Поэтому, 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 можно зарегистрировать межмолекулярные взаимодействия между молекулами с различным изотопным составом. В работе были проанализированы различные варианты изотопной фильтрации, было показано, что оптимальным подходом является фильтрация по ^{13}C с детекцией контактов метильных групп белка. Метод был опробован на Гликофореине А (GrA), для которого ранее уже была получена пространственная структура. Применение фильтрации позволило втрое увеличить число межмолекулярных контактов и уточнить структуру димера. В дальнейшем, структура GrA была определена и в составе фосфолипидных бицелл DMPC/DHPC, показав эквивалентность мицелл и бицелл для солюбилизации "сильных" димеров МБ. На следующем этапе были проведены работы по оптимизации методики. Были опробованы различные импульсные последовательности для изотопных фильтров и показано, что наименьшее количество "протечек" фильтра наблюдается для элемента с адиабатическими импульсами для инверсии намагниченности. Однако, даже для наиболее эффективного эксперимента в спектрах наблюдаются остаточные внутримолекулярные взаимодействия, что связано с неполным изотопным мечением, а также с присутствием 1% ^{13}C в натуральном

содержании. Поэтому, необходимо тщательно контролировать олигомерную форму объекта исследования.

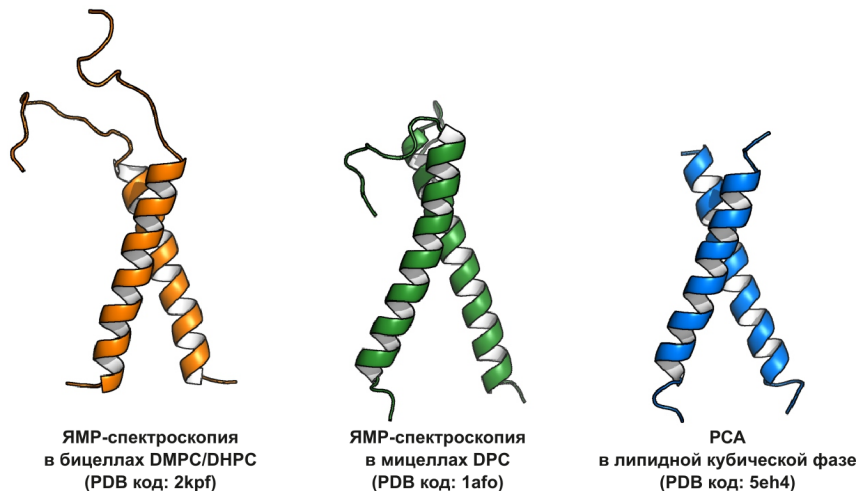


Рисунок 13. Пространственные структуры GrA в различном окружении. Структура 2kpf в бицеллах получена в рамках данной работы.

Даже несмотря на использование фильтрации для большинства межмолекулярных контактов оказалось невозможно предложить однозначное отнесение кросс-пиков, что приводило к ухудшению качества получаемых структур. Основная причина - перекрытие сигналов метильных групп в стандартных спектрах HSQC из-за гомоядерных констант спин-спинового взаимодействия. Для решения данной проблемы были предложены подходы на основе гомоядерной развязки и эволюции с постоянной задержкой по направлению ^{13}C . Анализ интенсивностей трёх различных спектров ^{13}C -HSQC ТМ домена VEGFR2 в мицеллах DPC, показал, что в среднем использование постоянной эволюции приносит выигрыш 19%, по сравнению с гомоядерной развязкой (Рис. 14), при этом качество спектра оказывается несоизмеримо выше. Для МБ содержащих 2-3 α -спирали при 40-45 °С в мицеллах HSQC с постоянной задержкой является оптимальным методом детекции метильных групп.

Были разработаны новые импульсные последовательности для всех экспериментов на основе ^{13}C -HSQC с постоянной задержкой, в том числе NOESY-CT-HSQC, ^{13}C -филт.-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. Спектр ^{13}C -филт.-NOESY-CT-HSQC был впервые применен в 2017 г. для получения сверх-точной структуры ТМ домена ErbB2/HER2 в мицеллах (HER2tm, 13 межмолекулярных кросс-пиков ЯЭО с однозначным отнесением).

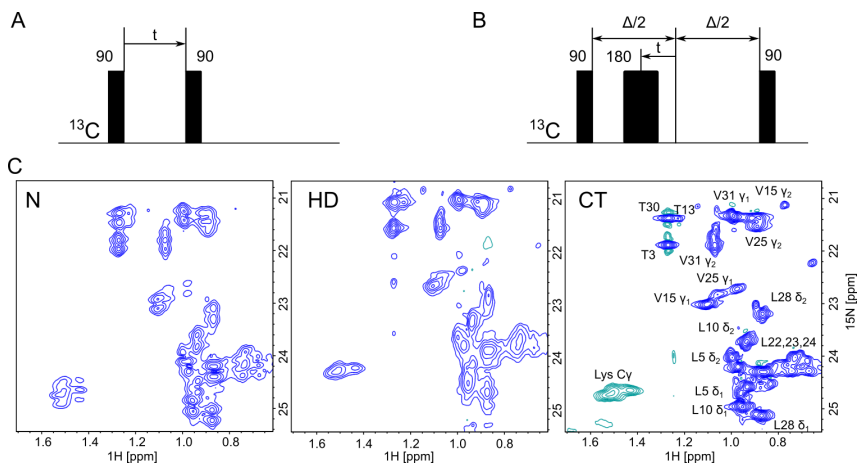


Рисунок 14. А,В - Элементы импульсных последовательностей, применяемые для детекции ^{13}C направлений спектров ЯМР в стандартных экспериментах (**А**) и с использованием постоянной задержки (**В**). **С** - фрагменты спектров ^1H , ^{13}C -HSQC, содержащие сигналы от метильных групп белка VEGFR2tm в мицеллах DPC. Спектры накоплены обычным образом (**Н**), с использованием гомоядерной развязки (**HD**) и с использованием постоянной задержки (**СТ**).

5.2. Картирование изменений химических сдвигов и параметров подвижности.

В ряде случаев оказывается невозможным достигнуть большого количества белка в необходимом состоянии из-за его склонности образовывать олигомеры высокого порядка. Тогда, одним из методов изучения структуры димеров является картирование изменений химических сдвигов. В этой связи, был сформирован тестовый набор из трех димеров ТМД (HER2 в мицеллах, EGFR в мицеллах, EGFR в бицеллах), для которых был проведен анализ предсказательной силы различных измеряемых параметров ЯМР - химических сдвигов амидных и метильных групп, а также параметров подвижности метильных групп. Был разработан подход для анализа - все наблюдаемые изменения аппроксимировались нормальным распределением, затем анализировались выбросы за одну или две величины среднеквадратичного отклонения (σ). Полученные выбросы сопоставлялись с набором остатков на интерфейсе димеризации, оценивалась положительная предсказательная сила (PPV) и чувствительность параметров.

Оказалось, что химические сдвиги амидных групп белков не могут применяться для предсказания интерфейсов. PPV параметра равен 0.23(0) при пороговом значении 1σ (2σ) для EGFR и 0.27(0.5) для HER2, что соответствует доле остатков на интерфейсе из общего числа аминокислот белка. Ситуация обстоит несколько лучше при анализе изменений химических сдвигов метильных групп. PPV CH_3 -групп составила 0.56 (1.0)

и 0.36 (1.0) для отсечки σ (2σ) при сравнительно малой чувствительности. Этот параметр можно 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).

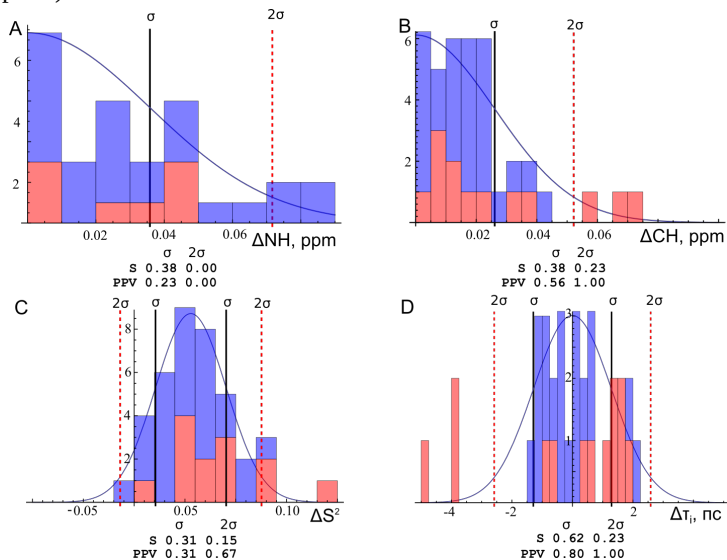


Рисунок 15. Распределения изменений обобщенного химического сдвига амидных (A) и метильных (B) групп, а также параметра порядка связи CC' (S^2_{CC} , C) и скоростей вращения метильных групп (τ_i , D) при димеризации HER2tm в мицеллах ДРС. Красные прямоугольники соответствуют группам/остаткам на интерфейсе димеризации. Пороговые величины σ и 2σ показаны черной и пунктирной красной линиями. Под графиками приведены рассчитанные значения PPV и S .

Для измерения подвижности метильных групп был использован модель-зависимый подход, предложенный Лесовым Д.М. Измерялись параметры ЯМР-релаксации ядер ^{13}C - скорость продольной релаксации R_1 и кросс-корреляция Γ_2 , из которых можно определить две характеристики - скорость вращения метильной группы вокруг связи C-C' (τ_i), а также параметр порядка связи C-C' (S^2_{CC}). В то время как S^2_{CC} не имеет предсказательной силы в отношении интерфейсов димеризации МБ, τ_i оказался превосходным индикатором: PPV уже на отсечке 1σ составила не менее 0.67, чувствительность также была значительной: 0.47-0.62, соответственно. Пример анализа приведён на рис. 15. Таким образом, τ_i является наиболее надёжным параметром, с высоким потенциалом успешного применения для предсказания поверхностей межмолекулярного взаимодействия.

Для использования отклонений параметров при построении моделей димеров ТМД был разработан подход на основе докинга. В программе TMDOCK получается набор потенциальных конформаций димеров, который затем ранжируется по количеству выбросов распределения того или иного параметра на интерфейсе димеризации. Как показал анализ результатов, если правильная структура димера присутствует в наборе начальных моделей, то она получает наивысшую оценку и выбирается в качестве финальной конформации. При этом, иногда оказывается невозможным различить структуры со схожим интерфейсом но различной (правой или левой) закруткой димера.

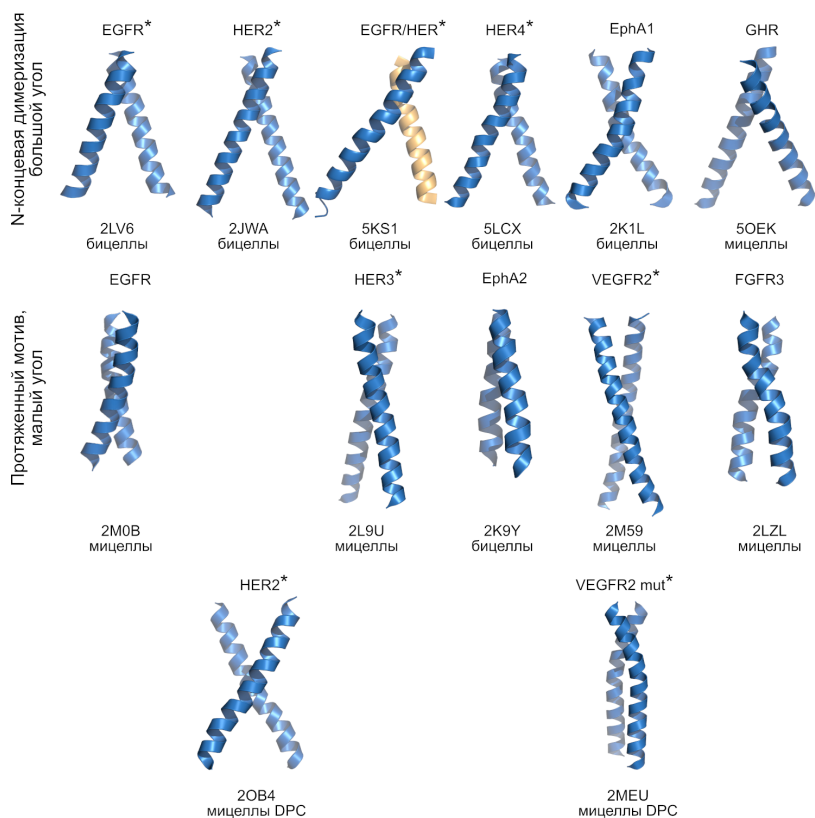


Рисунок 16. Полученные с использованием представленных в работе методик пространственные структуры димеров ТМД различных РТК. Структуры сгруппированы на основании типа упаковки димера. Приведены коды базы данных PDB и тип мембраноподобного окружения. Структуры, полученные при непосредственном участии автора отмечены *.

5.3. Практическое применение методик для определения структур димеров МБ.

Методы на основе гетероядерной фильтрации неоднократно и успешно использовались автором и другими сотрудниками ИБХ РАН для анализа димеризации различных МБ, в первую очередь РТК и TLR. На момент начала работы, информация о структуре ТМ доменов РТК отсутствовала, первая в мире структура димера ТМ домена РТК (HER2 в бицеллах DMPC/DHPC) была определена автором работы и опубликована в марте 2008 г. В 2010 г. была опубликована первая в мире структура гетеродимера ТМ доменов РТК (EGFR/HER2 в бицеллах), в 2011 - структура гомодимера ТМД HER3 в мицеллах DPC, в 2012 - HER4 в бицеллах. Другими сотрудниками ИБХ РАН в 2016 г. была представлена структура гомодимеров ТМД EGFR в мицеллах DPC. Таким образом был получен практический полный набор пространственных структур белков семейства HER в различных мембраноподобных окружениях. В 2017 году были получены альтернативные состояния гомодимеров EGFR (в бицеллах) и HER2 (в мицеллах DPC). 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 белков семейства. Автором были получены структуры димера ТМ домена VEGFR2, а также его двух мутантных форм. Другими сотрудниками ИБХ РАН были определены структуры димеров ТМД рецепторов EphA1, EphA2, FGFR3, GHR. Всего в лаборатории биомолекулярной ЯМР спектроскопии ИБХ РАН были получены 14 пространственных структур ТМД РТК (Рис. 16). 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.

В общем наборе можно выделить два кластера конформаций. В первом взаимодействии между α -спиралями осуществляется в основном в N-концевой области, интерфейс димеризации короткий, оси спиралей скрещиваются под большим углом 40-50° с образованием правой закрутки димера. При этом C-концы ТМ спиралей оказываются на большом расстоянии друг от друга, а N-концы сближены, 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. Второй кластер структур характеризуется протяжённым интерфейсом взаимодействия спиралей, малым углом скрещивания 10-20°. При этом, сближены оказываются как N-концы, так и C-концы ТМД. Можно предположить, что состояния такого типа соответствуют неактивной димерной форме рецепторов, что противоречит ряду гипотез,

высказанных ранее. Анализ структур выявил существенное влияние свойств мембраноподобного окружения на тип упаковки димера ТМД, что позволило 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.

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. Видно, что гликофориновые мотивы далеко не гарантируют образования стабильных ассоциатов ТМД. Для ряда белков (например, HER3 и EphA2), несмотря на наличие в последовательности одного или более гликофоринового мотива, димеризация осуществлялась с использованием другого интерфейса. Полный набор структур димеров ТМД использовался и для разработки новых методов предсказания конформаций пар взаимодействующих ТМ α -спиралей. Так, на основании приведённого набора настраивались параметры оценочных функций в таких пакетах программного обеспечения, как PREDDIMER и TMDOCK.

Вторым классом объектов, изучавшихся в рамках данной работы, являются толл-подобные рецепторы (TLR). Для ТМ домена TLR3 была получена структура не только димерной, но и тримерной формы. Очевидно, тример не является нативным состоянием ТМД - согласно данным рентгеноструктурного анализа внеклеточный домен TLR3 взаимодействует с вирусной РНК в димерном состоянии. С другой стороны, базовым элементом симметричного тримера является асимметричный димер, который может соответствовать лиганд-связанному состоянию TLR. Интересно, что полученная ранее модель полноразмерного TLR3 в комплексе с лигандом, основанная на кристаллических структурах внеклеточного и внутриклеточного доменов, предсказывает асимметричное взаимодействие ТМД, близкое по характеристикам к наблюдавшемуся в тримерной структуре ЯМР.

ТМ домен TLR4 был изучен в трех различных средах - мицеллах и двух типах бицелл. Было показано, что TLR4 характеризуется наличием длинной ТМ спирали (33 остатка) с включением заряженной аминокислоты (Lys), а анализ гидрофобных свойств всех TLR позволяет предположить, что такая структура ТМД характерна для большинства членов семейства. Из-за наличия олигомеров высокого порядка не удалось добиться необходимой концентрации димерной формы, поэтому конформация димера ТМД была получена с использованием картирования изменений химических сдвигов метильных групп. В программе TMDOCK был сгенерирован набор из 10 потенциальных конформаций димера, из

которых была выбрана одна финальная модель с наилучшей оценкой по предложенной в разделе 5.2. методике.

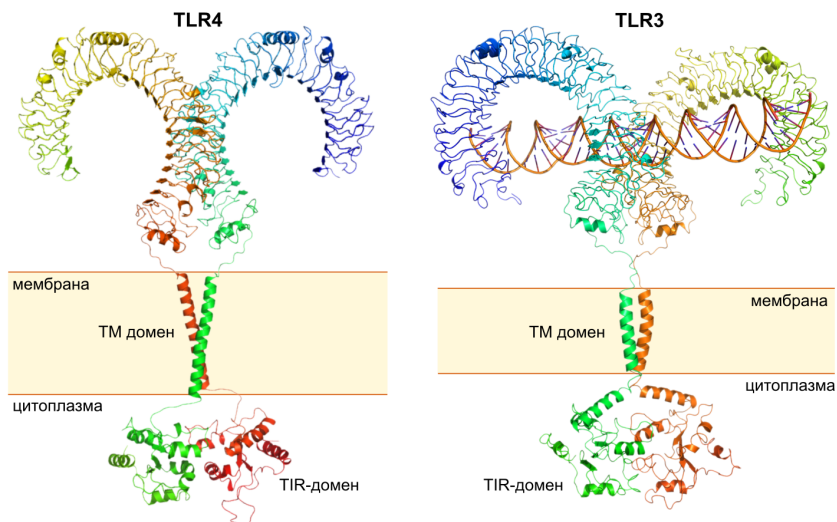


Рисунок 17. слева - модель полноразмерного рецептора TLR4, построенная в данной работе. Справа - опубликованная ранее модель полноразмерного рецептора TLR3.

На основании полученных данных была построена модель полноразмерного рецептора TLR4. Модель опирается на структуру димера внеклеточных доменов TLR4 в комплексе с липополисахаридом, на структуру димера внутриклеточных доменов TLR10, а также на структуру димера ТМД. Это первая модель TLR в димерном состоянии, которая основана на экспериментальных данных о структурной организации всех трёх частей рецептора - внеклеточной, трансмембранной и внутриклеточной. Сравнение полученной модели с предложенной ранее моделью TLR3 приводится на рис. 17. 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 TLR4 структура ТМД представляет собой длинную α -спираль, соединённую с TIR доменом рецептора неструктурированным линкером. Отметим, что модель TLR3 в области ТМД была построена на основании "здорового смысла" и ничего более, поэтому, можно заключить, что в рамках данной работы была получена первая точная модель рецептора семейства TLR.

В заключение отметим, что по результатам работы удалось предложить и оптимизировать два комплементарных метода установления структуры

димеров МБ при помощи ЯМР. Методы были опробованы на ряде объектов, что позволило получить важную информацию о принципах организации спиральных МБ, а также о механизмах работы нескольких клеточных рецепторов.

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.

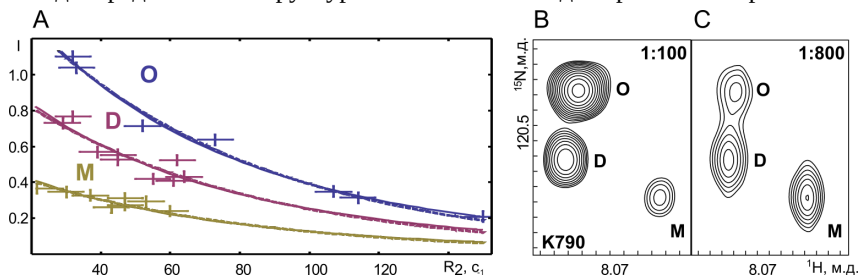


Рисунок 18. А - зависимость интенсивности сигналов трех форм VEGFR2tmV769E (мономер М, димер D и олигомер O) от скорости поперечной релаксации амидных протонов в спектре $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY. Данные аппроксимированы экспоненциальным спадом. В, С - фрагменты спектра $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -TROSY VEGFR2tmV769E полученного при соотношении липид/белок 100 и 800. Фрагменты содержат сигналы трех форм остатка K790.

6.1. Определение заселенностей олигомерных форм

Большинство методов измерения энергии димеризации (за исключением калориметрии) опираются на определение заселенностей 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 первом этапе и заключается в корректном преобразовании интенсивностей сигналов в спектрах ЯМР в заселенности различных состояний белка. Для решения проблемы в работе были предложены три подхода, основанных на учете параметров релаксации амидных групп. В рамках первой методики выбирались сигналы наиболее подвижных участков белка, где вклад от поперечной релаксации сравнительно мал, что позволяет минимизировать систематическую ошибку. В рамках второго подхода предлагалось анализировать интенсивности всех отдельно стоящих сигналов олигомерных форм белка, в зависимости от скорости

поперечной релаксации амидных протонов, аппроксимировать зависимость экспоненциальным спадом с одновременным определением заселенностей состояний (Рис. 18). Третий подход опирается на отслеживание изменений интенсивности сигналов при серийном разведении, которое лежит в основе всех экспериментов по измерению константы димеризации. Используется предположение, что при разведении не меняются параметры релаксации сигналов. Тогда, если скорректировать интенсивности с учётом разбавления, должна наблюдаться линейная зависимость интенсивностей сигналов от различных форм, из коэффициентов которой можно определить заселенности состояний. Второй метод является наиболее точным, но имеет ограниченную применимость, в то время как третий 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.

Вторая проблема, с которой сталкиваются при измерении энергии димеризации, заключается в выборе правильной модели процесса, происходящего при взаимодействии МБ в мицеллах детергента. Мицеллы не являются в полной мере аналогом жидкого растворителя - это дискретные частицы, размер которых зависит от свойств встроенного в них белка, для процесса в мицеллах не работает стандартная форма константы димеризации. Для решения проблемы была разработана специальная модель мицеллярного растворителя, основанная на предположении, что димеризация ТМД может происходить только при соударении двух мицелл с мономером с образованием мицеллы с димером и "пустой" мицеллы. В рамках модели константа равновесия имеет вид:

$$K_D = \frac{[M]^2}{[D][micE]^\gamma} \quad \text{или} \quad \Delta G_0 = RT \ln [M^2/D] - \gamma RT \ln [micE] \quad (5)$$

где $[micE]$ - концентрация пустых мицелл и γ - порядок реакции по пустым мицеллам. При этом,

$$[micE] \times Ne + [M] \times Nm + [D] \times Nd = [Lip] \quad , \quad \gamma = \frac{2Nm - Nd}{Ne} \quad (6).$$

Здесь Ne , Nm и Nd - число молекул детергента в мицелле без белка, с мономером и димером ТМД, соответственно. Совместное решение уравнений (5) и (6) позволяет получить выражение с четырьмя параметрами (K_D , Ne , Nm , Nd), которым можно аппроксимировать наблюдаемую зависимость концентраций мономера и димера белка от концентрации детергента, чтобы получить константу димеризации. Было показано, что модель (5) в состоянии описать димеризацию ТМД лучше, чем ряд других в широком диапазоне концентраций.

Подобный анализ может быть применён и в случае малых бицелл. Более того, можно воспользоваться моделями частиц из раздела 4 и уменьшить число параметров аппроксимации до одного - константы димеризации.

При этом, число липидов в бицеллах выражаются через параметры R , r и S_{prot} выражений (2) и (4), а также через плотность упаковки липидов (S_0), которую можно принять равной в бицеллах и бислоях.

$$N_i = \frac{2\pi(R-r-S_{prot})^2}{S_0} \quad (7).$$

С использованием предложенного подхода был проведен анализ димеризации ТМД HER4 в бицеллах DMPC/CHAPS разного размера. Было показано, что размер частиц не влияет на структуру димера. Измерения димеризации в бицеллах $q=0.5$ и $q=0.8$ 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 считать достоверным или, более того, существенным. Как будет показано позднее, изменение липидного состава бицелл приводит к гораздо более заметным эффектам.

6.3. Кинетика димеризации МБ.

Помимо свободной энергии интерес представляют и кинетические параметры процесса димеризации МБ - ведь на основании скорости переходов димер/мономер можно сделать вывод об энергетических барьерах. В рамках представленной работы эксперименты по серийному разбавлению проводились для 12 ТМ доменов в мицеллах DPC и для 4 ТМ доменов в бицеллах DMPC/DHPC. В случае мицелл DPC для всех изученных белков наблюдался медленный в шкале химического сдвига обмен мономер-димер. Для нескольких объектов 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. Таким образом, можно заключить, что в мицеллах DPC димеризация ТМ доменов происходит чрезвычайно медленно, скорость обмена $k_{ex} \ll 2 \text{ с}^{-1}$.

В бицеллах наблюдается совершенно иная картина, некоторые ТМД осуществляют быстрые переходы димер-мономер. Детально изучить кинетику обмена димер/мономер удалось для HER4tm в бицеллах DMPC/DHPC $q=0.3$. Константа скорости обмена мономер/димер составляет $30 \pm 5 \text{ с}^{-1}$, что как минимум на порядок быстрее обмена в мицеллах DPC. Анализ зависимости константы скорости от температуры показывает, что энергия активации димеризации равна 28 ккал/моль. Использование усложнённой модели позволяет оценить свободную энергию переходного состояния $\Delta G^\ddagger = 9$ ккал/моль. ΔG^\ddagger соответствует вкладу взаимодействий белок/липид и липид/липид, который необходимо компенсировать за счёт взаимодействий белок/белок при димеризации.

6.4. Практическое применение разработанных методик

Предложенные методы были опробованы на нескольких ТМД. В частности в случае ТМД рецептора VEGFR2 был изучен механизм действия мутаций, которые вызывают спонтанную активацию полноразмерного VEGFR2 (G770E/F777E), а также VEGFR2 с делецией

внеклеточного домена (V769E). Три ТМД (дикий тип и две мутантных формы) были получены бесклеточным синтезом, структура димера и энергия димеризации изучены в мицеллах DPC. По данным ЯМР, все три белка характеризовались идентичной вторичной структурой, боковые цепи ТМ остатков Glu не заряжены при нейтральных pH. В то время как белок дикого типа и двойной мутант образовывали две формы, мономер и димер, белок с заменой V769E находился в трех состояниях - мономер, димер и симметричный тример, для анализа равновесия между ними была применена методика на основе модели мицеллярного растворителя (Рис. 19). Структуры димеров VEGFR2tmV769E и VEGFR2tm идентичны, при этом структура димера двойного мутанта существенно иная. При сходстве общей геометрии (угол между осями спиралей, расстояние между спиральями), интерфейс димеризации оказался на противоположной стороне ТМ сегмента. VEGFR2tm образует димер с $\Delta G_0 = -4.6 \pm 0.2$ 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, активация VEGFR2 с делетированным внеклеточным доменом возникает не из-за усиления димеризации, а за счет изменения характера взаимодействия между ТМД. 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. Приведенный пример показывает, что измерение свободной энергии значительно расширяет возможности при изучении механизма действия точечных мутаций.

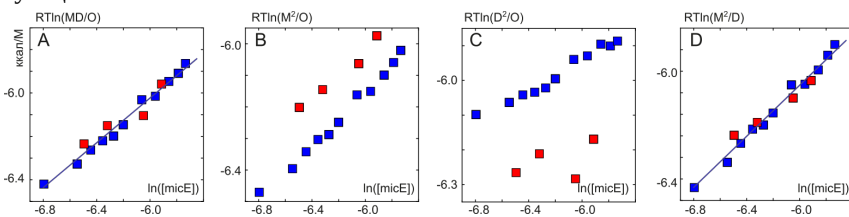


Рисунок 19. Зависимость $RT\ln(X)$ от $\ln([micE])$ для различных моделей равновесия мономер-димер-олигомер VEGFR2tmV769E. Для "истинных моделей" данные до и после резкого разбавления водой (синие и красные точки) образуют одну прямую.

Методику измерения свободной энергии предлагается применить и для анализа влияния окружения на поведение МБ. Так, влияние толщины бислоя на структуру и стабильность димеров ТМД можно изучать с использованием изотропных бицелл с варьируемым липидным составом. Такое исследование было проведено на белке HER4tm, который был встроен в бицеллы DLPC/CHAPS, DMPC/CHAPS, DPPC/CHAPS и POPC/CHAPS с $q=0.5$. Оказалось, что влияние толщины бислоя на структуру димера HER4tm минимально - картина "двоения" сигналов в

спектрах ЯМР образцов идентична (Рис. 20). С другой стороны, стабильность димеров менялась существенным образом. Если в DMPC наблюдалась самая слабая димеризация, $\Delta G_0 = -1.2 \pm 0.2$ 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 .

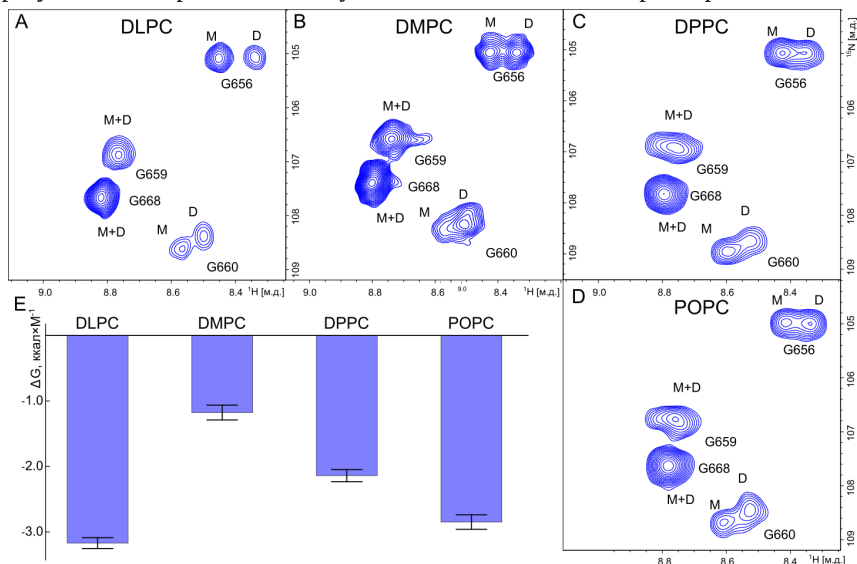


Рисунок 20. А-Д - фрагменты спектров ^1H , ^{15}N -TROSY белка HER4tm в бицеллах на основе CHAPS, приготовленных с использованием различных фосфолипидов при $q=0.5$, 30 °С, рН 6.0. Е - свободные энергии димеризации HER4tm в бицеллах на основе различных фосфолипидов при $q=0.5$.

Наконец, подход позволяет получить данные, необходимые для установления взаимосвязи между структурой и энергией димеров ТМ α -спиралей. В свою очередь, такая взаимосвязь нужна для развития методов предсказания *in silico* структур α -спиральных МБ. Поэтому, для большинства белков (11), для которых удалось разрешить структуры димеров были параллельно измерены значения свободной энергии. Полученные величины позволяют сделать ряд заключений. Подтверждается переоцененность роли гликофориновых мотивов, наиболее стабильными являются структуры ТМД, в которых на интерфейсе димеризации обнаруживаются полярные боковые цепи, такие как Asn в TLR3 или Glu в случае мутантов VEGFR2. При этом, самый стабильный димер ТМД дикого типа, образуется в случае VEGFR2tm, в димеризации которого основную роль играют ароматические остатки и

неполярные объёмные боковые цепи. 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.

6.5. Преимущества и недостатки предложенных подходов

Для понимания границ применимости и преимуществ предложенного подхода необходимо рассмотреть другие схожие методы, например ультрацентрифугирование, FRET и калориметрию. Недостатки подхода лежат на поверхности, и, в первую очередь, связаны с различными ограничениями инструментального метода. Для проведения измерений требуются значительные количества изотопно-меченого образца, нельзя изучать МБ, образующие слишком стабильные димеры. 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

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 "плавающая" 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. Благодаря разделённому измерению заселённости состояний можно анализировать сложные равновесия между несколькими олигомерными формами объектов. 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.

7. Методы исследования структуры крупных фрагментов клеточных рецепторов.

7.1. Формулировка подхода.

Все белки с одним ТМ сегментом сейчас исследуют по частям - белок разделяется на отдельные домены, разрешаются их пространственные структуры, после чего предпринимаются попытки собрать модель полноразмерного рецептора в различных функциональных состояниях. Однако, несмотря на ряд случаев успешного использования, такой подход сопряжён с рядом присущих ему недостатков. В первую очередь, теряется информация о взаимосвязи между состояниями отдельных доменов. С другой стороны, оперируя ограниченным набором состояний отдельных

доменов мы теряем информацию о движениях, которые приводят к переключениям между состояниями. Ведь мишенью, для которой производится разработка лекарства, может быть и переходная, а не основная, форма молекулы. С учётом всего сказанного выше 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, первыми объектами были избраны конструкторы, содержащие трансмембранные домены и цитоплазматические примембранные регионы (ЦПР) 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. В случае других белков удалось достигнуть определённых результатов. Для EGFR было показано, что структура примембранного региона зависит от типа мембраноподобной среды - в мицеллах наблюдалось образование короткой α -спирали, в то время как в бицеллах ЦПР оказались неструктурированными. При этом, по результатам анализа химических сдвигов, ЦПР принимают участие в димеризации белка. Для рецептора HER2 была определена пространственная структура димера конструктора в мицеллах детергента. 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+} было выявлено, что ТМД и ЦПР-А экранированы от растворителя, в то время как петля между доменами экспонирована в водное окружение, что дополнительно подтверждается контактами ЯЭО белок-детергент. В димеризации белка участвуют обе спирали (ТМД и ЦПР-А). Анализ структур димера конструкций ТМД и ТМД-ЦПР показал, что наличие ЦПР влияет на структуру димера ТМД, то есть состояния доменов взаимосвязаны.

В случае рецептора нейротрофинов p75NTR цитоплазматические примембранные регионы белка получили собственное название - домен "чоппер". Даже небольшой части внутриклеточного домена p75NTR (домена "чоппер") достаточно, чтобы вызвать гибель нейронов. Для исследования домена была создана конструкция p75-ТМ-чоппер, структура которого была изучена в трех различных средах: мицеллах DPC, бицеллах DMPC/DHPC $q=0.3$ и ЛБН DMPC/DMPG/MSP1D1 4:1. Для анализа 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 домен "чоппер" (N277-I308) неупорядочен во всех средах (Рис. 21). Если положение кросс-пиков от ТМД существенно различилось в мицеллах и бицеллах, химические сдвиги сигналов от остатков домена "чоппер" оставались неизменными. То есть, "чоппер" никак не взаимодействует с мембраной. Согласно параметрам релаксации, "чоппер" чрезвычайно подвижен в пс-нс диапазоне скоростей процессов. 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.

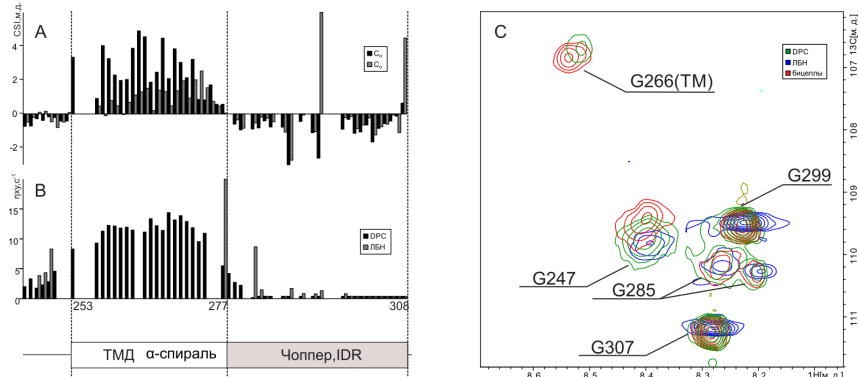


Рисунок 21. **А** - индекс вторичного химического сдвига ядер $^{13}\text{C}\alpha$ и $^{13}\text{C}\beta$ белка р75-ТМ-чоппер в мицеллах DPC. **В** - скорость кросс-скорелированной релаксации амидных групп р75-ТМ-чоппер в мицеллах DPC и в ЛБН. **С** - суперпозиция фрагментов трех спектров $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC р75-ТМ-чоппер в мицеллах DPC (показан зеленым), ЛБН (синим) и бицеллах (красным). Фрагменты содержат сигналы от остатков Gly, отнесение сигналов приведено.

Можно заключить, что добавление даже небольших частей, как примембранные регионы, к ТМД белков позволяет 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

Успешные примеры исследования слитных конструкций ТМД с примембранными регионами позволили предположить, что схожую работу можно провести и с более крупными фрагментами, содержащими как ТМ,

так и полноразмерный цитоплазматический домен (ЦПД) МБ. В этой связи, была изучена конструкция, содержащая ТМД и ЦПД рецептора р75NTR - фрагмент массой 21 кДа, включающий остатки 245-425 (далее - р75-ΔECD). ЦПД р75 включает в себя три условных домена - "чоппер" на N-конце, глобулярный "домен смерти" (ДС) на C-конце и линкерный участок между ними, который предположительно неструктурирован. По результатам скрининга мембраноподобных сред исследование проводилось в ЛБН MSP1D1/DMPC/DMPG 4:1. Кросс-пики в спектрах ^{15}N -HSQC р75-ΔECD могут быть легко подразделены на два множества - сигналы от остатков домена смерти и сигналы от "чоппер" и линкерного доменов. Сигналы от домена смерти в точности совпадают со спектром изолированного домена, следовательно наличие липидной мембраны ЛБН никак не влияет на структуру этой части р75NTR. Структура домена в составе р75-ΔECD и ЛБН идентична конформации домена в воде, что подтверждается анализом химических сдвигов в программе TALOS-N (Рис. 22). Весь линкерный регион и "чоппер", неупорядочены. Сигналы остатков "чоппера" 284-303 расположены в тех же самых позициях, что и в спектрах изученной ранее конструкции р75-ТМ-чоппер. То есть конформационное пространство неструктурированного домена никак не изменяется из-за присутствия в составе слитной конструкции "домена смерти" р75NTR. Для анализа движений р75-ΔECD, для большинства остатков белка были измерены параметры релаксации ядер ^{15}N . Параметры релаксации выявляют чрезвычайно высокую подвижность линкерного участка. При этом, ДС белка относительно стабилен с точки зрения пс движений (ЯЭО=0.9), однако время корреляции вращательной диффузии (τ_c) составляет 6 ± 1 нс, что сравнительно мало. Для ДС в растворе в отсутствие остальных частей белка ожидается τ_c равное 5.8 нс. Иными словами, движения ДС р75NTR в мономерной форме никак не сопряжены с движениями ТМ α -спирали, линкерный участок и чоппер неупорядочены и подвержены движениям в пс-нс диапазоне, ни один из доменов белка не выявляет способности взаимодействовать с липидными мембранами.

Для изучения взаимодействия между доменами смерти р75, которое должно происходить с точки зрения общепринятого механизма активации, были приготовлены образцы, где несколько копий белка р75-ΔECD приходилось на одну частицу ЛБН, для образца с содержанием белка на ЛБН 6:1 были измерены параметры ЯМР-релаксации ядер ^{15}N . Оказалось, что вращательная диффузия ДС 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. Таким образом, со-локализация нескольких копий р75-ΔECD в одном ЛБН не приводит к стабильной и специфической ассоциации доменов смерти рецептора, возникают только короткоживущие неспецифические контакты.

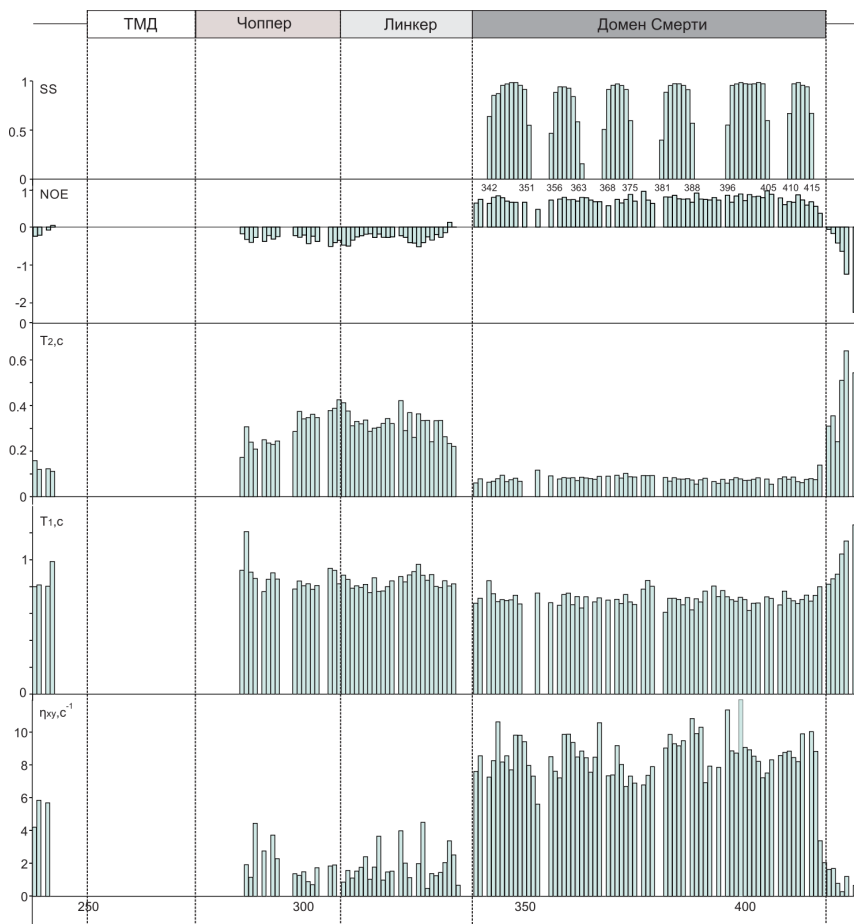


Рисунок 22. Структура и параметры релаксации ^{15}N p75-ΔECD в ЛБН DMPC/DMPG/MSP1D1. SS -вторичная структура, предсказанная на основании химических сдвигов в программе TALOS. +1 соответствует α-спирали, -1 - β-структуре. T1, T2 - времена продольной и поперечной релаксации, ρ_{xy} - кросс-корреляция $^1\text{H}/^{15}\text{N}$.

Совместный анализ всех данных о структуре белков p75-ТМ-чоппер и p75-ΔECD показывает, что предложенный ранее механизм "snail tong", принятый для активации p75NTR не может соответствовать действительности, поскольку домены смерти рецептора не способны образовывать стабильное димерное состояние в присутствии мембраны, ТМД и неструктурированных линкерных участков. Для объяснения всех особенностей работы рецептора (ковалентная димеризация в неактивной форме, отсутствие димера ДС и пр.) были сформулированы два гипотетических механизма активации, основанные либо на миграции белка

в рафты клеточной мембраны либо на протеолизе с образованием активных С-концевых фрагментов при связывании лиганда.

Аналогичным образом была изучена структура гомолога р75 - полноразмерного белка с 1 ТМ сегментом NRADD в бицеллах DMPC/CHAPS. 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 р75NTR и содержит домен смерти и линкерный участок неизвестной структуры. Проведённое исследование показало, что N-концевой домен неструктурирован. Цитоплазматический домен состоит из двух частей - неупорядоченного примембранного участка и глобулярного домена смерти с характерной шестиспиральной укладкой. Неупорядоченность N- и С-концевых примембранных регионов подтверждается отсутствием контактов ЯЭО дальнего диапазона, а также анализом химических сдвигов. В целом, структура NRADD соответствует данным об организации рецептора р75NTR и напоминает рецептор без массивного эктодомена. Аналогично р75NTR, время корреляции вращательной диффузии домена смерти в составе NRADD (6.8 ± 1.5 нс) лишь слегка выше, чем предсказано для изолированного домена (5.8 нс), что говорит об отсутствии взаимосвязи между состоянием ТМД и ЦПД. Примембранные регионы не накладывают ограничения на движения ДС, а также не взаимодействуют с поверхностью бицелл DMPC/CHAPS за исключением 5-6 наиболее близких к мембране остатков, сигналы которых не наблюдаются в спектрах ЯМР. Дополнительно, анализ подвижности позволяет заключить, что домены смерти NRADD не димеризуются/олигомеризуются.

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 р75-ΔECD, пока 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.

Заключение.

По результатам работы создан набор методов для изучения димеризации/олигомеризации МБ на основе ЯМР: (1) методы, связанные с получением близкого к нативному окружения МБ при помощи липидных бицелл, (2) методы определения структуры димеров и тримеров МБ, а также (3) методы измерения термодинамических параметров равновесия между различными олигомерными формами МБ. Указанный набор является достаточным для получения широкого объема информации об организации МБ. Методы были опробованы на нескольких белках класса

МБ-1 и продемонстрировали хорошие перспективы их применения, в том числе в отношении крупных фрагментов клеточных рецепторов. Предложена концепция изучения структуры и динамики многодоменных конструкций МБ-1 при помощи ЯМР. Исследования такого рода, позволяют получить дополнительную информацию о структурных основах функционирования белков, которая теряется при их изучении по частям. Можно сделать следующие выводы:

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-EPС 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 СС' 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 ТLR4. Построена первая модель полноразмерного ТLR 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 ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Статьи в международных рецензируемых журналах:

1. Bocharov E.V., **Mineev K.S.**, Volynsky P.E., Ermolyuk Y.S., Tkach E.N., Sobol A.G., Chupin V.V., Kirpichnikov M.P., Efremov R.G., Arseniev A.S. 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.
2. **Mineev K.S.**, Bocharov E.V., Pustovalova Y.E., Bocharova O.V., Chupin V.V., Arseniev A.S. Spatial structure of the transmembrane domain heterodimer of ErbB1 and ErbB2 receptor tyrosine kinases // *J. Mol. Biol.* 2010. Vol. 400, № 2. P. 231–243.
3. **Mineev K.S.**, Bocharov E.V., Volynsky P.E., Goncharuk M.V., Tkach E.N., Ermolyuk Y.S., Schulga A.A., Chupin V.V., Maslennikov I.V., Efremov R.G., Arseniev A.S. Dimeric structure of the transmembrane domain of glycoporphin a in lipidic and detergent environments // *Acta Naturae.* 2011. Vol. 3, № 2. P. 90–98.
4. **Mineev K.S.**, Khabibullina N.F., Lyukmanova E.N., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Arseniev A.S. Spatial structure and dimer–monomer equilibrium of the ErbB3 transmembrane domain in DPC micelles // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. Vol. 1808, № 8. P. 2081–2088.
5. Bocharov E.V., **Mineev K.S.**, Goncharuk M.V., Arseniev A.S. Structural and thermodynamic insight into the process of “weak” dimerization of the ErbB4

- transmembrane domain by solution NMR // *Biochim. Biophys. Acta*. 2012. Vol. 1818, № 9. P. 2158–2170.
6. Manni S., **Mineev K.S.**, Usmanova D., Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Kirpichnikov M.P., Winter J., Matkovic M., Deupi X., Arseniev A.S., Ballmer-Hofer K. Structural and functional characterization of alternative transmembrane domain conformations in VEGF receptor 2 activation // *Structure*. 2014. Vol. 22, № 8. P. 1077–1089.
7. **Mineev K.S.**, Lesovoy D.M., Usmanova D.R., Goncharuk S.A., Shulepko M.A., Lyukmanova E.N., Kirpichnikov M.P., Bocharov E.V., Arseniev A.S. 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.
8. **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.
9. **Mineev K.S.**, Goncharuk S.A., Kuzmichev P.K., Vilar M., Arseniev A.S. NMR Dynamics of Transmembrane and Intracellular Domains of p75^{NTR} in Lipid-Protein Nanodiscs // *Biophys. J*. 2015. Vol. 109, № 4. P. 772–782.
10. **Mineev K.S.**, Panova S.V., Bocharova O.V., Bocharov E.V., Arseniev A.S. The Membrane Mimetic Affects the Spatial Structure and Mobility of EGFR Transmembrane and Juxtamembrane Domains // *Biochemistry*. 2015. Vol. 54, № 41. P. 6295–6298.
11. Bragin P.E., **Mineev K.S.**, Bocharova O.V., Volynsky P.E., Bocharov E.V., Arseniev A.S. HER2 Transmembrane Domain Dimerization Coupled with Self-Association of Membrane-Embedded Cytoplasmic Juxtamembrane Regions // *J. Mol. Biol*. 2016. Vol. 428, № 1. P. 52–61.
12. **Mineev K.S.**, Nadezhdin K.D., Goncharuk S.A., Arseniev A.S. Characterization of Small Isotropic Bicelles with Various Compositions // *Langmuir*. 2016. Vol. 32, № 26. P. 6624–6637.
13. Nadezhdin K.D., García-Carpio I., Goncharuk S.A., **Mineev K.S.**, Arseniev A.S., Vilar M. Structural Basis of p75 Transmembrane Domain Dimerization // *Journal of Biological Chemistry*. 2016. Vol. 291, № 23. P. 12346–12357.
14. **Mineev K.S.**, Nadezhdin K.D. Membrane mimetics for solution NMR studies of membrane proteins // *Nanotechnology Reviews*. 2017. Vol. 6, № 1. P. 13–32.
15. **Mineev K.S.**, Nadezhdin K.D., Goncharuk S.A., Arseniev A.S. Façade detergents as bicelle rim-forming agents for solution NMR spectroscopy // *Nanotechnology Reviews*. 2017. Vol. 6, № 1. P. 93–103.
16. **Mineev K.S.**, Goncharuk S.A., Goncharuk M.V., Volynsky P.E., Novikova E.V., Arseniev A.S. Spatial structure of TLR4 transmembrane domain in bicelles provides the insight into the receptor activation mechanism // *Sci Rep*. 2017. Vol. 7, № 1. P. 6864.
17. Bocharov E.V., **Mineev K.S.**, Pavlov K.V., Akimov S.A., Kuznetsov A.S., Efremov R.G., Arseniev A.S. 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.

18. Lesovoy D.M., **Mineev K.S.**, Bragin P.E., Bocharova O.V., Bocharov E.V., Arseniev A.S. 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.

19. Kot E.F., Goncharuk S.A., Arseniev A.S., **Mineev K.S.** Phase Transitions in Small Isotropic Bicelles // *Langmuir*. 2018. Vol. 34 № 11 P. 3426-3437

20. Kot E.F., Arseniev A.S., **Mineev K.S.** Behavior of Most Widely Spread Lipids in Isotropic Bicelles // *Langmuir*. 2018. Vol. 34, № 28. P. 8302–8313.

21. Bragin P.E., Kuznetsov A.S., Bocharova O.V., Volynsky P.E., Arseniev A.S., Efremov R.G., **Mineev K.S.** 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.

22. Nadezhdin K.D., Goncharuk S.A., Arseniev A.S., **Mineev K.S.** NMR structure of a full-length single-pass membrane protein NRADD // *Proteins*. 2019. Vol. 87. №. 9. P. 786-790

23. Wang Y., Peng Y., Zhang B., Zhang X., Li H., Wilson A.J., **Mineev K.S.**, Wang X. Targeting trimeric transmembrane domain 5 of oncogenic latent membrane protein 1 using a computationally designed peptide // *Chemical Science*. 2019. Vol. 10, № 32. P. 7584–7590.

Избранные тезисы докладов конференций:

24. **Mineev K.S.**, Lesovoy D.M., Usmanova D.R., Goncharuk S.A., Shulepko M.A., Lyukmanova E.N., Kirpichnikov M.P., Bocharov E.V., Arseniev A.S. NMR-based approach to measure the free energy of transmembrane helix-helix interactions.// *Euromar-2103 Book of Abstracts*. 2013. Hersonissos, P. 365TH

25. **Mineev K.S.**, Manni S., Usmanova D.R., Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Deupi X., Ballmer-Hofer K., Arseniev A. Structural and functional investigation of the role of the transmembrane domain in the VEGF receptor 2 activation // *FEBS Journal*. 2014. Vol. 281(s1). P.79

26. **Mineev K.**, Bragin P., Bocharov E., Bocharova O., Arseniev A. NMR investigation of transmembrane and juxtamembrane domains of HER2 receptor kinase in the dimeric state // *Euromar-2105 Book of Abstracts*. 2015. P. 600-601

27. **Mineev K.**, Goncharuk S., Nadezhdin K., Goncharuk M., Kot E., Artemieva L., Arseniev A. Studying the large fragments of single-pass membrane proteins by NMR in solution. // *EUROMAR WARSAW 2017 Abstract Book*. 2017. P. 49

28. **Mineev K.**, Goncharuk S., Kot E., Nadezhdin K., Bragin P., Bocharova O., Arseniev A. Isotropic bicelles: new rim-forming agents, lipid phase transitions and application in the studies of single-pass membrane proteins by NMR in solution", // *XXVIIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*. 2018. P. 95

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

- АУЦ - аналитическое ультрацентрифугирование
- ДС - домен смерти
- ДСР - динамическое светорассеяние
- ж.-к. - жидко-кристаллический
- ЛБН - липид-белковые нанодиски
- МБ - мембранный белок
- МБ-1 - мембранный белок с 1 трансмембранным сегментом, битопный белок
- МУРН - малоугловое рассеяние рентгеновских лучей
- МПС - мембраноподобная среда
- РТК - рецепторная тирозинкиназа
- ТЗР - температурно-зависимый рост бицелл
- ТМ - трансмембранный
- ТМД - трансмембранный домен
- ЦПД - цитоплазматический домен
- ЦПР - цитоплазматический примембранный регион
- ЯМР - ядерный магнитный резонанс
- ЯЭО - ядерный эффект Оверхаузера
- FRET - индуктивно-резонансный перенос энергии флюоресценции
- HER - человеческие рецепторы факторов роста эпителия
- PPV - положительная предсказательная сила
- TLR - толл-подобные рецепторы
- VEGFR - рецепторы факторов роста сосудистого эндотелия

Липиды и детергенты:

- СМ - сфингомиелин
- ФЭ - фосфатидилэтаноламин
- ФС - фосфатидилсерин
- ФГ - фосфатидилглицерин
- CHAPS - 3-[(3-холамидопропил)-диметиламмоний]-1-пропансульфонат
- CHAPSO - 3-[(3-холамидопропил)-диметиламмоний]-2-гидрокси-1-пропансульфонат
- DHPC - дигексаноилфосфатидилхолин
- DH₇PC - дигептаноилфосфатидилхолин
- DLPC - дилауроилфосфатидилхолин
- DMPC - димиристоилфосфатидилхолин
- DMPG - димиристоилфосфатидилглицерин
- DPC - додецилфосфохолин
- DPPC - дипальмитоилфосфатидилхолин
- POPC - пальмитоилолеоилфосфатидилхолин