

ФУНКЦИЯ КОНСЕРВАТИВНЫХ «НЕФУНКЦИОНАЛЬНЫХ» ОСТАТКОВ В АПОМИОГЛОБИНЕ – ОБЕСПЕЧИТЬ И СОХРАНИТЬ ПРАВИЛЬНУЮ ТОПОЛОГИЮ БЕЛКА

Мини-обзор

© 2023 В.Е. Бычкова¹, Д.А. Долгих², В.А. Балобанов^{1*}

¹ Институт белка РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: balobanov@phys.protres.ru

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871 Москва, Россия

Поступила в редакцию 18.07.2023

После доработки 18.07.2023

Принята к публикации 31.08.2023

В предлагаемой работе на основании анализа работ трёх лабораторий получен ответ на вопрос О.Б. Птицына: какова роль консервативных нефункциональных остатков в апомиоглобине. Выявлена решающая роль консервативных нефункциональных остатков в апомиоглобине в образовании нативной топологии в состоянии расплавленной глобулы этого белка. Это позволяет предположить, что нефункциональные консервативные остатки в этом белке необходимы для фиксации и сохранения правильной топологии основных элементов его вторичной структуры в промежуточном состоянии. Правильная топология является нативным элементом в этом состоянии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апомиоглобин, консервативные остатки, стабильность белка, сворачивание белка, нативная топология.

DOI: 10.31857/S0320972523110192, **EDN:** MNCECS

Посвящается памяти О.Б. Птицына

ВВЕДЕНИЕ

Предлагаемая вашему вниманию работа является небольшим обзором литературных данных с целью получения однозначного ответа на вопрос, заданный почти 30 лет назад.

В 90-х гг. прошлого столетия широко обсуждалось сворачивание белков, особенно белков с промежуточными состояниями [1, 2]. Был предложен ряд моделей для механизма сворачивания белка, включая неспецифический коллапс [3], иерархическую модель [1, 2, 4], модель диффузии-столкновения [5] и механизм нуклеации-роста, вовлекающий образование переходного состояния [6, 7]. Последний механизм включает две модели переходного состояния – неспецифического, требующего

только некоторого [8] или даже довольно большого [9] числа нативо-подобных контактов, и специфического, зависящего от чётко определённого ядра сворачивания [6, 10]. В 1996 г. был предложен метод определения такого ядра сворачивания, использующий эволюционно консервативные остатки и предполагающий их участие в образовании ядра сворачивания [11].

В том же 1996 г. О.Б. Птицын обнаружил, что в ряде глобинов наблюдаются консервативные остатки, не участвующие в связывании гема, т.е. нефункциональные. Этот факт был позднее подтверждён для 728 глобиновых последовательностей [12]. Важной особенностью данных остатков было их расположение внутри гидрофобного ядра белковой глобулы. Такое расположение разом отмечает варианты

Принятые сокращения: А, G и Н – основные альфа-спирали апомиоглобина; ароMb – апомиоглобин; MG – состояние расплавленной глобулы; SW ароMb – апомиоглобин кашалота.

* Адресат для корреспонденции.

консервативности остатков, связанные с меж-белковыми взаимодействиями и посттрансляционными модификациями. Таким образом, выявленные остатки, казалось бы, не участвуют ни в каких функциях белка. Как итог, явная консервативность и неясная важность для белка сформировали вопрос о роли этих аминокислотных остатков. Для ответа на этот вопрос потребовалось много лет работы трёх крупных лабораторий: лаборатории физики белка, организованной О.Б. Птицыным, лаборатории П. Райта в Сан-Диего (США) и лаборатории Х. Родера (Филадельфия, США). Теперь, опираясь на исследования этих лабораторий, мы можем провести анализ и однозначно ответить на вопрос о роли консервативных нефункциональных аминокислотных остатков апомиоглобина (ароMb).

К 1996 г. в лаборатории П. Райта (Сан-Диего)* был сконструирован ген апомиоглобина кашалота (SW ароMb), самого стабильного из миоглобинов [13], для получения белка в прокариотических экспрессионных системах. Таким образом, появилась возможность манипуляций с его аминокислотной последовательностью и экспериментальной проверки того, на что влияет замена консервативных нефункциональных остатков — на скорость сворачивания белка, на его стабильность или на что-то другое. Было предположено, что эти остатки важны для быстрого и правильного сворачивания белка [12]. Используя совместный с П. Райтом грант, одним из нас (Д.Д.) были сконструированы плазмиды мутантных ароMb, включавшие замены всех консервативных остатков на Ala, а также некоторых из них на Trp и Met. В дополнение к ним были сконструированы плазмиды и для нескольких замен неконсервативных остатков, которые могли быть важны для перехода из состояния расплавленной глобулы (MG) в нативное (N) состояние или для кинетического сворачивания и разворачивания полученных мутантных белков. Интенсивное исследование в нативных условиях при pH 6,2 показало, что замена консервативных остатков на Ala сильно сказывается на стабильности структуры SW ароMb относительно разворачивания, особенно на его стабильности в промежуточном состоянии, и заметно слабее — на кинетике его сворачивания [14]. Следует отметить, что измерения кинетики в то время ограничивались миллисекундным интервалом (мёртвое время прибора — доли миллисекунды). В зависимо-

сти от условий эксперимента при равновесном разворачивании SW ароMb наблюдались один [15, 16] или два [17] интермедиата. За последующие годы техника эксперимента была существенно усовершенствована, позволяя измерять всё более быструю кинетику сворачивания белков [18–20].

С использованием микросекундной кинетики было предпринято исследование равновесного и кинетического сворачивания/разворачивания SW ароMb дикого типа [20] и MG мутантных белков с заменами как консервативных, так и неконсервативных остатков в лаборатории Х. Родера** [21]. В результате этих работ было показано, что сворачивание SW ароMb при pH 4,2 проходит через один или два промежуточных состояния в зависимости от растворителя. При этом замена консервативных остатков слабо сказывается в переходе $U \rightarrow$ интермедиат L (U — развёрнутое состояние), но начинает сильно влиять на стабильность конечного структурного состояния MG при pH 4,2.

РОЛЬ НЕФУНКЦИОНАЛЬНЫХ КОНСЕРВАТИВНЫХ ОСТАТКОВ

Таким образом, изучение равновесного и кинетического сворачивания/разворачивания SW ароMb при pH 4,2 [21] показало, что замена консервативных остатков сильнее всего сказывается на стабильности состояния расплавленной глобулы (ароMb MG) при pH 4,2, а также на стабильности нативного состояния этого белка, как это было показано ранее [14]. Замена консервативных остатков не оказала существенного влияния на скорость сворачивания SW ароMb ни при нейтральном pH, ни при pH 4,2 в состоянии MG. Особенно важно, что состояние L отделено от состояния MG конформационным переходом. Оба этих состояния имеют сходную вторичную структуру, но в состоянии MG элементы этой структуры взаимно ориентированы и образуют нативоподобную топологию. Такой результат указал на важность консервативных остатков для стабилизации состояния MG и взаимной ориентации элементов вторичной структуры в нём.

Дополнительный анализ экспериментальных данных в работе Mizukami et al. [21] чётко показал, что роль консервативных остатков резко возрастает при переходе из интермедиата L в состояние MG при pH 4,2. В работах

* P. Wright, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037, USA.

** H. Roder, Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave, Philadelphia, PA 19111.

Nishimura et al. и Aoto et al. [22, 23] показано, что в этом же переходе происходит образование связей между консервативными остатками. Это позволяет удерживать положение А-спирали в комплексе с G- и H-спиралями. Для SW ароMb было показано наличие контактов между А-, G- и H-спиралями в состоянии MG. В лаборатории П. Райта методом ЯМР было обнаружено, что в процессе сворачивания ароMb в промежуточном состоянии сначала возникает ненативный контакт между консервативными остатками на спирали H (Leu135) и спирали G (Leu115), а при формировании нативного состояния — уже между правильными остатками Leu135 и Ile111 [22, 23]. С другой стороны, в работе итальянских исследователей было показано, что замена Trp14 в спирали А на Met в миоглобине (Mb) из *Aplysia limacina* ведёт к одновременной замене Met130 в спирали H (аналога остатка 131 в SW ароMb) на Trp [24], т.е. сохраняется тот же контакт между спиралями А и H. Следует отметить, что Trp130 в этом белке образует четыре из шести консервативных нефункциональных связей с другими остатками [24].

Консерватизм аминокислотных остатков в последовательности говорит об их биологической значимости. Для определения этой значимости необходимо выяснить, насколько важна стабильность состояния MG в клетке и в каких процессах белок может переходить в такое состояние. Образование MG при pH 4,2 ставит вопрос о том, где же в клетке можно наблюдать сходные условия. Напомним путь биосинтеза ароMb в клетке. Он синтезируется на рибосомах вблизи мембраны эндоплазматического ретикула (ER), pH около которой составляет 5–6, и связывается с ней. Затем полипептидная цепь ароMb перемещается (движется) вдоль мембраны ER и достигает места соединения мембраны ER и внешней митохондриальной мембраны, поверхность которой уже заряжена отрицательно. Таким образом, pH ~4 может наблюдаться около внешней мембраны митохондрии, а это — условия образования MG! Образовавшаяся структура ароMb, связанная с мембраной, способна связывать гем, синтезируемый только в митохондриях.

Однако после связывания гема образовавшийся холо-Mb уже не имеет сродства к мембране, выходит в цитоплазму и никогда не возвращается во внешнюю мембрану митохондрии. Таким образом, pH ~4 необходим как для связывания апобелка с внешней мембраной митохондрии, так и для связывания гема. Ранее нами было показано, что ароMb в его нативном состоянии и в состоянии MG спо-

собен связываться с отрицательно заряженной поверхностью мембран [25]. Таким образом, условие pH ~4, казавшееся сначала трудновыполнимым, становится реальностью при анализе условий биосинтеза ароMb в клетке.

Теперь следует вспомнить, в чём главное отличие нативного состояния белка от состояния MG. Для нативной формы белка характерна плотная упаковка боковых групп и нативная топология, т.е. нативное расположение основных элементов вторичной структуры. Для состояния MG характерно отсутствие плотной упаковки боковых групп, но в нём сохраняется нативная топология — нативное расположение основных элементов вторичной структуры. У SW ароMb в состоянии MG отсутствует плотная упаковка боковых групп, но сохраняется нативная топология (взаимное расположение) основных А-, G- и H-спиралей. Возникает вопрос: что позволяет сохранять нативное взаимное расположение спиралей в этом состоянии при отсутствии плотной упаковки боковых групп? Разумно было бы предположить, что спирали должны быть каким-то образом скреплены. В этом случае наличие консервативных остатков, попарно расположенных на А-, G- и H-спиралях и взаимодействующих между собой, как раз и было бы той скрепкой, которая позволила бы удерживать их правильное расположение в состоянии MG.

Как было показано нами [26], SW ароMb обладает высокой аффинностью к мембране. Его нативная и развёрнутая в мочевице формы в присутствии мембран связываются с ними, приобретая состояние, которое по спектральным и флуоресцентным свойствам сходно с ароMb в состоянии MG. Поэтому изучение структуры белков, связанных с мембранами, представляет особый интерес, особенно в случае SW ароMb, когда есть возможность изучить влияние замен нефункциональных консервативных остатков на изменение структуры белка в мембране, вызванное этими заменами. Таким образом, любые данные о структуре ароMb, связанного с мембраной, будут интересны с точки зрения неизвестной структуры MG ароMb и тех изменений, которые вносят замены нефункциональных консервативных остатков. Экспериментально доказать правильную топологию ароMb и его мутантных форм с заменами нефункциональных консервативных остатков в состоянии типа MG, по-видимому, можно, изучив структуру белка, связанного с мембраной, с использованием новейших методов ЯМР.

Таким образом, основываясь на результатах работ Mizukami et al., Nishimura et al.,

Aoto et al. и Musto et al. [21, 22–24], на примере ароМб можно впервые сделать чёткое предположение: «Нефункциональные консервативные остатки в белках необходимы для фиксации и сохранения правильной топологии основных элементов вторичной структуры белка в промежуточном состоянии типа MG. Правильная топология является нативным элементом в этом состоянии». Для ароМб это означает сохранение AGH-комплекса, возможно, дополненного близлежащими неконсервативными остатками В- и Е-спиралей. Насколько нам известно, в работе Mizukami et al. [21] впервые показано, что наблюдается переход между интермедиатом с топологией и интермедиатом с просто подобной вторичной структурой. В этой же работе показано в первый раз, что нативная топология может быть «расплавлена» изменением рН, так как образование нативной топологии наблюдается в переходе рН 2 – рН 4,2.

Сходная ситуация наблюдается и для цитохрома с [27], для которого обнаружено четыре консервативных остатка, расположенных по два на N- и С-спиралях, что позволяет удерживать их в комплексе на поверхности митохондрии.

По-видимому, для фиксации правильной топологии в белках природа использует не только связи между нефункциональными консервативными остатками. Возможно, ту же роль выполняют консервативные изгибы петель, что наблюдается для клеточного белка, связывающего ретиноловую кислоту [28–30], или же это обеспечивает правильное образование S-S-связей, что наблюдается в семействе лактальбумин/лизоцимов [31], где консервативные остатки располагаются близко к S-S-связям.

Возможно ли проецировать выявленные нами закономерности на сворачивание других белков? Да! Принципы самоорганизации одинаковы для всех белков – пусть пока не до конца нами поняты и детально описаны, но одинаковы! Как мы утверждаем, наличие консервативных остатков в гидрофобном ядре белка и отсутствие явной их функциональной значимости являются достаточно чёткими критериями для биоинформатического поиска остатков, важных в процессе сворачивания. При этом, как нами показано в данной статье, одна из возможных ролей таких остатков – формирование правильной топологии полипептидной цепи на промежуточных этапах сворачивания. Значимость промежуточных состояний белков для жизни клетки позволяет таким остаткам законсервироваться в последовательности.

Вклад авторов. В.Е. Бычковой и Д.А. Долгих проведён дополнительный анализ экспериментальных данных; В.Е. Бычкова, Д.А. Долгих и В.А. Балобанов участвовали в написании статьи.

Благодарности. Авторы выражают свою глубокую благодарность П.Е. Райту за его помощь и поддержку, а также структурные данные, Х. Родеру за полученные важные результаты и их обсуждение, Е.В. Серебровой за помощь в подготовке статьи, а также всем исследователям, принимавшим участие в изучении апомиоглобина.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kim, P. S., and Baldwin, R. L. (1990) Intermediates in the folding reactions of small proteins, *Ann. Rev. Biochem.*, **59**, 631–660, doi: 10.1146/annurev.bi.59.070190.003215.
2. Ptitsyn, O. B. (1991) How does protein synthesis give rise to the 3D-structure? *FEBS Lett.*, **285**, 176–181, doi: 10.1016/0014-5793(91)80799-9.
3. Dill, K. A., Fiebig, K. M., and Chan, H. S. (1993) Cooperativity in protein folding kinetics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1942–1946, doi: 10.1073/pnas.90.5.1942.
4. Ptitsyn, O. B. (1973) Stages in the mechanism of self-organisation of protein molecules, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **210**, 1213–1215.
5. Karplus, M., and Weaver, D. L. (1994) Protein folding dynamics: the diffusion-collision model and experimental data, *Protein Sci.*, **3**, 650–668, doi: 10.1002/pro.5560030413.
6. Abkevich, V. I., Gutin, A. M., and Shakhnovich, E. I. (1994) Specific nucleus as the transition state for protein folding: evidence from the lattice model, *Biochemistry*, **33**, 10026–10036, doi: 10.1021/bi00199a029.
7. Guo, Z., and Thirumalai, D. (1995) Kinetics of protein folding: nucleation mechanism, time scales, and pathways, *Biopolymers*, **36**, 83–102, doi: 10.1002/bip.360360108.

8. Wolynes, P. G., Onuchic, J. N., and Thirumalai, D. (1995) Navigating the folding routes, *Science*, **267**, 1619-1620, doi: 10.1126/science.7886447.
9. Finkelstein, A. V., and Badretdinov, A. Y. (1997) Rate of protein folding near the point of thermodynamic equilibrium between the coil and the most stable chain fold, *Fold. Des.*, **2**, 115-121, doi: 10.1016/s1359-0278(97)00016-3.
10. Fersht, A. R. (1995) Optimization of rates of protein folding: The nucleation-condensation mechanism and its implications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10869-10873, doi: 10.1073/pnas.92.24.10869.
11. Shakhnovich, E. I., Abkevich, V., and Ptitsyn, O. B. (1996) Conserved residues and the mechanism of protein folding, *Nature*, **379**, 96-98, doi: 10.1038/379096a0.
12. Ptitsyn, O. B., and Ting, K. L. (1999) Non-functional conserved residues in globins and their possible role as a folding nucleus, *J. Mol. Biol.*, **291**, 671-682, doi: 10.1006/jmbi.1999.2920.
13. Jennings, P., and Wright, P. E. (1993) Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of myoglobin, *Science*, **262**, 892-896, doi: 10.1126/science.8235610.
14. Samatova, E. N., Melnik, B. S., Balobanov, V. A., Katina, N. S., Dolgikh, D. A., Semisotnov, G. V., Finkelstein, A. V., and Bychkova, V. E. (2010) Folding intermediate and folding nucleus for I-N and U-I-N transitions in apomyoglobin: Contributions by conserved and non-conserved residues, *Biophys. J.*, **98**, 1694-1702, doi: 10.1016/j.bpj.2009.12.4326.
15. Elieser, D., Jennings, P. A., Wright, P. E., Doniach, S., Hodgson, K. O., and Tsuruta, H. (1995) The radius of gyration of an apomyoglobin folding intermediate, *Science*, **270**, 487-488, doi: 10.1126/science.270.5235.487.
16. Hughson, F. M., Wright, P. E., and Baldwin, R. L. (1990) Structural characterization of a partly folded apomyoglobin intermediate, *Science*, **249**, 1544-1548, doi: 10.1126/science.2218495.
17. Jamin, M., and Baldwin, R. L. (1998) Two forms of the pH 4 folding intermediate of apomyoglobin, *J. Mol. Biol.*, **276**, 491-504, doi: 10.1006/jmbi.1997.1543.
18. Shastry, M. C. R., and Roder, H. (2004) Evidence for barrier-limited protein folding kinetics on the microsecond time scale, *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 385-392, doi: 10.1038/nsb0598-385.
19. Roder, H., Maki, K., and Cheng, H. (2006) Early events in protein folding explored by rapid mixing methods, *Chem. Rev.*, **106**, 1836-1861, doi: 10.1021/cr040430y.
20. Xu, M., Beresneva, O., Rosario, R., and Roder, H. (2012) Microsecond folding dynamics of apomyoglobin at acidic pH, *J. Phys. Chem. B*, **116**, 7014-7025, doi: 10.1021/jp3012365.
21. Mizukami, T., Xu, M., Fazlieva, R., Bychkova, V. E., and Roder, H. (2018) Complex folding landscape of apomyoglobin at acidic pH revealed by ultrafast kinetic analysis of core mutants, *J. Phys. Chem. B*, **122**, 11228-11239, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b06895.
22. Nishimura, C., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2006) Identification of native and non-native structure in kinetic folding intermediates of apomyoglobin, *J. Mol. Biol.*, **355**, 139-156, doi: 10.1016/j.jmb.2005.10.047.
23. Aoto, P. C., Nishimura, C., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2014) Probing the non-native H helix translocation in apomyoglobin folding intermediates, *Biochemistry*, **53**, 3767-3780, doi: 10.1021/bi035319l.
24. Musto, R., Bigotti, M. G., Travaglini-Allocatelli, C., Brunori, M., and Cutruzzola, F. (2004) Folding of *Aplysia limacina* apomyoglobin involves an intermediate in common with other evolutionarily distant globins, *Biochemistry*, **43**, 230-236, doi: 10.1021/bi035319l.
25. Балобанов В. А., Ильина Н. Б., Катина Н. С., Кашпаров И. А., Долгих Д. А., Бычкова В. Е. (2010) Кинетика взаимодействия между апомиоглобином и фосфолипидными мембранами, *Мол. Биол. (Москва)*, **44**, 708-711.
26. Bychkova, V. E., Basova, L. V., and Balobanov, V. A. (2014) How membrane surface affects protein structure, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 1483-1514, doi: 10.1134/S0006297914130045.
27. Ptitsyn, O. B. (1998) Protein folding and protein evolution: common folding nucleus in different subfamily of c-type cytochromes? *J. Mol. Biol.*, **278**, 655-666, doi: 10.1006/jmbi.1997.1620.
28. Rotondi, K. S., and Gierasch, L. M. (2003) Local sequence information in cellular retinoic acid-binding protein I: specific residue roles in beta-turns, *Biopolymers*, **71**, 638-651, doi: 10.1002/bip.10592.
29. Rotondi, K. S., and Gierasch, L. M. (2003) Role of local sequence in the folding of cellular retinoic acid-binding protein I: structural propensities of reverse turns, *Biochemistry*, **42**, 7976-7985, doi: 10.1021/bi034304k.
30. Gunasekaran, K., Haqler, A. T., and Gierasch, L. M. (2004) Sequence and structural analysis of cellular retinoic acid-binding proteins reveal a network of conserved hydrophobic interactions, *Proteins*, **54**, 179-194, doi: 10.1002/prot.10520.
31. Ting, K.-L. H., and Jernigan, R. L. (2002) Identifying a folding nucleus for the lysozyme/alpha-lactalbumin family from sequence conservation clusters, *J. Mol. Evol.*, **54**, 425-436, doi: 10.1007/s00239-001-0033-x.

THE FUNCTION OF THE CONSERVED “NON-FUNCTIONAL” RESIDUES IN APOMYOGLOBIN IS TO PROVIDE AND PRESERVE THE CORRECT PROTEIN TOPOLOGY

Mini-Review

V. E. Bychkova¹, D. A. Dolgikh², and V. A. Balobanov^{1*}

¹ *Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: balobanov@phys.protres.ru*

² *Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
117871 Moscow, Russia*

In this paper the answer to O. B. Ptitsyn's question “What is the role of conserved non-functional residues in apomyoglobin” is presented, which is based on the research results of three laboratories. The role of conserved non-functional apomyoglobin residues in formation of native topology in the molten globule state of this protein is revealed. This fact allows suggesting that the conserved non-functional residues in this protein are indispensable for fixation and maintaining main elements of the correct topology of its secondary structure in the intermediate state. The correct topology is a native element in the intermediate state of the protein.

Keywords: apomyoglobin, conservative residues, protein stability, protein folding, native topology