

ЗАПРЕЩЕННЫЕ КОНФОРМАЦИИ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ НА ПРИМЕРЕ β -ИЗГИБА β -ШПИЛЬКИ В SH3-ДОМЕНЕ α -СПЕКТРИНА

© 2015 г. Л.А. Урошлев, И.Ю. Торшин*, А.В. Батяновский**,
Н.Г. Есипова, В.Г. Туманян

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
119991, Москва, ул. Вавилова 32;*

**Химический факультет Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр.3;*

***Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, 220072, Минск, ул. Академическая, 27*

E-mail: leoniduroshlev@gmail.com

Поступила в редакцию 28.11.14 г.

Приводятся результаты исчерпывающего конформационного анализа β -изгибов, содержащих аминокислоту с запрещенной конформацией остова полипептидной цепи. Известно, что для первого остатка β -изгиба (Asn47) дистальной β -шпильки SH3-домена α -спектрина характерна стерически запрещенная конформация основной цепи (значения двугранных углов Φ и Ψ находятся в правом нижнем квадранте карты Рамачандрана). Были проанализированы все структуры α -спектринов из банка PDB, содержащие аномальные элементы. Предложена идея, заключающаяся в том, что формирование запрещенной конформации обусловлено фиксацией (за счет структуры SH3-домена) примыкающих к β -изгибу аминокислотных остатков β -структуры. Эти остатки ориентированы таким образом, что конформация остатков β -изгиба должна задействовать именно запрещенную локальную конформацию этого остатка, в то время как любые другие конформации β -изгиба (которые бы имели разрешенную локальную конформацию) невозможны. С целью доказательства правомерности данной идеи проведен конформационный анализ β -изгиба путем варьирования всех внутренних координат (две пары углов Φ и Ψ и два угла ω). В результате полного перебора по сетке с шагом 1° были отобраны конформации, соответствующие стереохимически допустимым локальным деформациям сегмента полипептидной цепи, входящего в β -изгиб. Установлено, что во всех полученных конформациях локальная конформация Asn47 оставалась в запрещенной области. Выявленные конформации включают экспериментально определенную структуру из банка PDB, а также дополнительный вариант, отличающийся от экспериментально установленных структур значениями пары углов Φ и Ψ второго остатка, принадлежащего β -изгибу. Значения этих углов попадают в область карты Рамачандрана вблизи линии $\Phi = 0$ при отрицательных значениях Ψ , т.е. на запрещенную область, в которой не наблюдается экспериментальных точек. Таким образом, сформулированная идея, состоящая в том, что запрещенная конформация «навязывается» β -изгибу фиксацией примыкающих к нему остатков, подтверждается результатами проведенных вычислений. Топологические ограничения в контексте структуры в такого типа β -шпильках исключают разрешенные локальные конформации.

Ключевые слова: SH3-домен, запрещенные конформации, β -изгиб, конформационный анализ.

После того как Рамачандран с сотр. [1] построили карту допустимых конформаций основной цепи для аминокислотного остатка (точнее, для дипептидной единицы) и на эту карту стали наносить конформации остатков белков, расшифрованных методом рентгеноструктурного анализа, оказалось, что достаточно большой процент экспериментально определенных конформаций попадает в стерически запрещенные

области. Вначале все эти случаи пытались объяснить ошибками эксперимента и/или тем, что сами контуры на карте могут изменяться вследствие изменения структурных параметров остова полипептидной цепи. Тем не менее по мере увеличения точности определения структуры число аномальных конформаций хотя и существенно падало, но так и не достигало нуля. Достаточно много таких конформаций

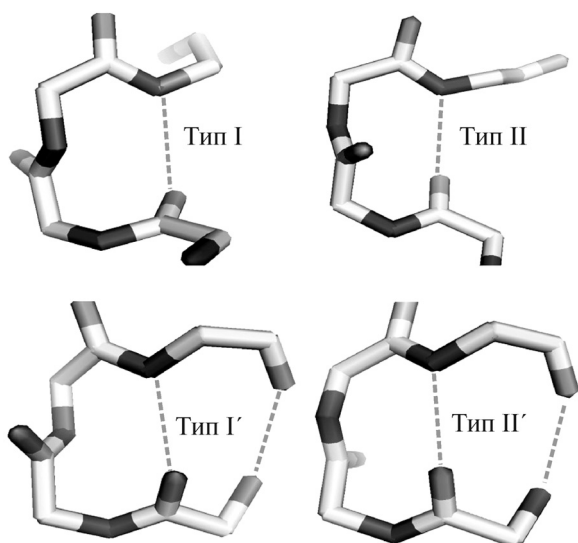


Рис. 1. Конформации двух остатков, образующих β -изгиб β -шпильки, для четырех основных типов β -изгиба: I, II, I' и II'.

сохранилось, следовательно, и проблема запрещенных конформаций осталась.

В настоящее время феномен существования запрещенных конформаций как таковых является установленным фактом. Во-первых, появились структуры, определенные со сверхвысоким разрешением, указывающие на такие конформации при отсутствии ошибок определения структуры. Во-вторых, аномальные структурные элементы воспроизводимо наблюдаются и при среднем разрешении, о чем свидетельствует постоянно возрастающее количество структур, содержащих этот элемент.

В частности, авторы работы [2] насчитывают на карте Рамачандрана шесть областей запрещенных конформаций. В настоящей работе мы рассматриваем область II' (II согласно номенклатуре, приведенной в работе [2]), соответствующую конформации первого остатка из двух остатков, образующих β -изгиб II'-типа. Значения двугранных углов для этого остатка лежат в правом нижнем квадранте карты Рамачандрана – самом стерически запрещенном квадранте (эта область двугранных углов разрешена только для остатков глицина).

Конформация β -изгиба II'-типа проиллюстрирована на рис. 1 вместе с другими основными типами β -изгибов. Значения двугранных углов $(i + 1)$ -остатка (L1 в номенклатуре согласно работе [3]) в β -изгибе находятся в области II' карты Рамачандрана, а значения двугранных углов для $(i+2)$ -остатка (L2) в β -изгибе лежат в пограничной области между областью, соот-

ветствующей α -спирали, и областью, содержащей β -структуру и левоспиральную конформацию типа полипролин II. Согласно последним оценкам [4] типичные значения двугранных углов составляют округленно $\Phi = 60^\circ$, $\Psi = -125^\circ$ для первого остатка в изгибе и $\Phi = -95^\circ$, $\Psi = 5^\circ$ для второго остатка.

Какие же взаимодействия препятствуют реализации конформаций полипептидной цепи в области правого нижнего квадранта карты Рамачандрана? При $\Phi < 50^\circ$ контактное расстояние между атомом O предыдущего остатка и атомом C' становится существенно меньше суммы соответствующих ван-дер-ваальсовых радиусов. При угле $\Phi = 60 \pm 30^\circ$ и Ψ от -100° до 30° возникает выраженное стерическое затруднение между атомом O предыдущего остатка и атомом H последующего. При $\Phi > 70^\circ$ имеет место недопустимое сближение атома O предыдущего остатка и боковой группы (R) остатка, конформация которого изучается. Область в непосредственной близости от точки $\Phi = 60^\circ$, $\Psi = -120^\circ$ (т.е. интересующая нас область) уникальна тем, что в ней имеет место неблагоприятный контакт в основном одного типа, а именно R и H последующего остатка, характерный вообще для значений Φ от -100° до -170° . Поэтому конформация такого типа в большинстве случаев реализуется только для остатков глицина, для которого радикалом является атом водорода.

Интересно, что второй остаток в II'- β -изгибе (остаток $i+2$) также имеет конформацию, несвободную от стерических ограничений, так как при Ψ , близком к нулю, наблюдается неблагоприятный контакт между N остатка, конформация которого изучается, и атомом H последующего остатка.

Приведенные выше данные соответствуют стандартной стереохимии полипептидной цепи. В реальных структурах напряженные ван-дер-ваальсовы контакты несколько смягчаются за счет изменения относительно стандартных значений валентных и двугранных углов. В работе [5] дается реальная картина деформации геометрии полипептидной цепи в представительной выборке структур, соответствующих II'-области карты Рамачандрана. C_β -атом оказывается слишком близким как к атому кислорода предыдущего остатка, так и к атому азота последующего остатка (эти напряженные контакты отсутствуют только в случае глицина). Компенсаторные деформации геометрии остова полипептидной цепи, частично ослабляющие эти напряженные контакты, включают раскрытие валентных углов $C_\beta C_\alpha C'$ и $C_\alpha C'$ и N последую-

шего остатка. Для компенсации раскрытия вышеупомянутых валентных углов уменьшаются валентные углы $NC_{\alpha}C'$, $C_{\alpha}C'O$ и OC' и N последующего остатка. В результате, как утверждают авторы [5], расстояние $C_{\beta}...N$ последующего остатка увеличивается с 2,65 до 2,71 Å, а расстояние от атома кислорода O предыдущего остатка... C_{β} увеличивается с 3,06 до 3,09 Å.

В настоящей работе в качестве объекта исследования мы выбрали β -изгиб дистальной β -шпильки SH3-домена α -спектрина. Для этого конкретного примера запрещенной конформации (Asn47 в положении $i+1$ β -изгиба) имеется наиболее полная информация, включающая рентгеноструктурные и микрокалориметрические данные, в том числе по рекомбинантным белкам с аминокислотными заменами. На рис. 2 показана структура дистальной β -шпильки для белка, определенная с наиболее высоким разрешением (1,1 Å).

Повышенная стабильность β -шпильки с аномальным элементом в β -изгибе SH3-домена α -спектрина подтверждается как экспериментальными, так и теоретическими свидетельствами [6–8]. В экспериментальном исследовании [9] авторы произвели замены аспарагина на другие аминокислоты (N47G и N47A). Однако ни термодинамический, ни рентгеноструктурный анализ не позволили обнаружить существенного влияния замен на термодинамические характеристики или конформацию белка.

В работе [8] было обнаружено, что область SH3-домена, соответствующая дистальной β -шпильке, остается стабильной в ходе денатурирующей молекулярной динамики. Стабильность сохраняется, несмотря на стерические препятствия в β -изгибе, также и в аспекте сохранения динамической сетки водородных связей. В результате биоинформатического анализа был сделан вывод, что Asn47 локализуется в β -изгибе специфического структурного фрагмента, который был назван перекрученной β -шпилькой. Было обнаружено, что фрагменты со сходной конформацией достаточно широко представлены в несводимой подвыборке белковых цепей из банка PDB и по сравнению с обычными β -шпильками характеризуются повышенным содержанием глицина в их β -изгибах, отсутствием определенных водородных связей типа остов-остов в их β -шпильках и увеличенным значением индекса хиральности по сравнению с обычными β -шпильками.

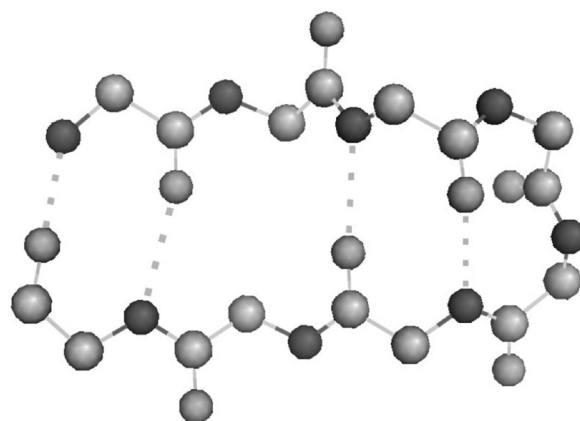


Рис. 2. β -Шпилька с β -изгибом, содержащим запрещенную конформацию 47-го остатка (L1 из β -изгиба). Шароигловая модель для фрагмента структуры 3MOR (разрешение 1,1 Å). Водородные связи показаны пунктиром.

МЕТОДЫ

Методическая цель настоящей работы – провести исчерпывающий конформационный анализ β -изгибов, содержащих аминокислоту с запрещенной конформацией основной цепи. Это позволит выяснить место этой конформации во всем наборе возможных конформаций. Наша основная идея состоит в том, что β -шпилька (особенно если это перекрученная β -шпилька), в силу своей высокой стабильности, фиксирует положение крайних остатков i и $i+3$, соединяющихся остатками β -изгиба $i+1$ и $i+2$. Набор конформаций, который может принимать эта перемычка или линкер, весьма ограничен, и иная конформация остатка $i+1$, кроме запрещенной, невозможна. Таким образом, должен иметь место *топологический замок*, поскольку принятие остатком $i+1$ стерически допустимой конформации потребовало бы перестройки структуры всей шпильки.

Конформация β -изгиба должна рассматриваться в рамках концепции локальных деформаций полипептидной цепи Шераги с сотр. [10,11]. Забегая вперед, надо сказать, что конформационный анализ в этих случаях сталкивается с принципиальными трудностями. В работах [10,11] было показано, как найти конформацию цикла или псевдоцикла (когда речь идет о конформациях линкера, соединяющего фиксированные в пространстве группы атомов), а точнее, как найти все шесть переменных, которые становятся зависимыми, численным методом. Фиксация концов петли, точно так же, как и замыкание цикла, делают зависимыми шесть переменных, причем в качестве таковых, как правило, выбираются двугранные углы (в

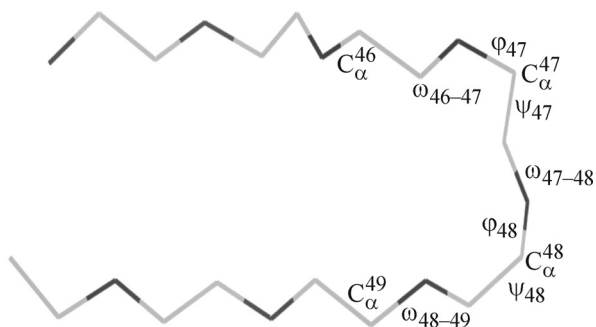


Рис. 3. Переменные, задающие конформацию β -изгиба. Показан отрывок полипептидной цепи для той же структуры, что и на рис. 2.

крайнем случае, некоторые зависимые углы могут быть валентными углами, включение же в число переменных валентных связей нерационально, поскольку эти связи практически нерастяжимы). Однако в работах [10,11] не было дано математически строгого решения задачи, поскольку число корней уравнений оставалось неизвестным и не было представлено гарантий того, что найденные численным методом решения (конформации) суть *все возможные* решения задачи.

В работе Ведемейера и Шераги [12] задача замыкания петель, содержащих разное число остатков, сводится к решению алгебраических уравнений, и, казалось бы, строгое решение, наконец, найдено. В работе [12] специально рассматривается случай β -изгиба, т.е. случай, когда звено, соединяющее два остатка, считающихся фиксированными в пространстве, содержит два остатка.

В литературе нет сведений о программах, реализующих алгоритмы Ведемейера и Шераги. Поэтому мы написали программу замыкания цикла через β -изгиб, используя формулы из работы [12] для этого случая, и провели ее отладку на тестовых примерах. Однако применение программы для реальных структур β -изгибов не привело к успеху: значения зависимых переменных, которые получались как корни уравнений из [12], отличались от значений соответствующих параметров в реальных структурах. Анализ показал, что причина несоответствия лежит в неплоскости пептидных групп в реальных структурах, т.е. в отклонении угла ω от 180° , тогда как формулы в работе [12] выведены в предположении равенства ω -углов 180° (соответственно в тестовых примерах, использованных нами для отладки программы, пептидные группы полагались плоскими). Материал по значениям углов ω в реальных структурах приведен в разделе «Результаты».

В силу того, что в связи с неплоскостью пептидных групп количество переменных, определяющих конформацию цикла через изгиб, возросло, и по этой причине использование формализма Ведемейера и Шераги [12] стало невозможным, для проведения конформационного анализа мы приняли решение использовать метод полного перебора по всем существенным переменным, дополненный оптимизацией целевой функции замыкания цикла от этих переменных. Такой метод, при условии достаточной малости шага перебора, позволяет получить весь набор конформаций.

В задаче замыкания β -шпильки линкером типа β -изгиба использовались аминокислоты с 46-й по 49-ю (включительно), при этом 46-я и 49-я аминокислоты (и связанные с ними локальные системы координат) полагались фиксированными в пространстве.

Конформация линкера задается шестью переменными, причем ровно столько переменных становятся зависимыми при фиксации концов линкера. Эти переменные (две пары углов Φ и Ψ и два угла ω) показаны на рис. 3.

Критерием корректности структуры было совпадение координат атома C' 47-й аминокислоты при вычислениях координат, начиная с неподвижной 46-й аминокислоты, при обходе контура по направлению хода полипептидной цепи, и координат этого же атома при вычислениях, начиная с неподвижной 49-й аминокислоты, при обходе контура по направлению, противоположному ходу полипептидной цепи (см. рис. 3). Точно также дважды вычислялись координаты атома N 48-й аминокислоты. Для отнесения всех координат к единой системе координат вычислялась матрица вращения и вектор трансляции между системами координат, связанными с неподвижными 46-й и 49-й аминокислотами.

Для вычисления координат атома C' 47-й аминокислоты при обходе по направлению полипептидной цепи достаточно принять в расчет угол ω_{46-47} (угол ω между 46-м и 47-м остатками) и угол Φ_{47} . Для вычисления координат этого же атома C' 47-й аминокислоты при обходе в направлении, противоположном направлению полипептидной цепи, надо учитывать угол ω_{48-49} и углы Ψ_{48} и Φ_{48} .

Для вычисления координат атома N 48-й аминокислоты при обходе по направлению полипептидной цепи надо принять в расчет угол ω_{46-47} и углы Φ_{47} и Ψ_{47} . Для вычисления координат атома N 48-й аминокислоты при обходе в направлении, противоположном направлению

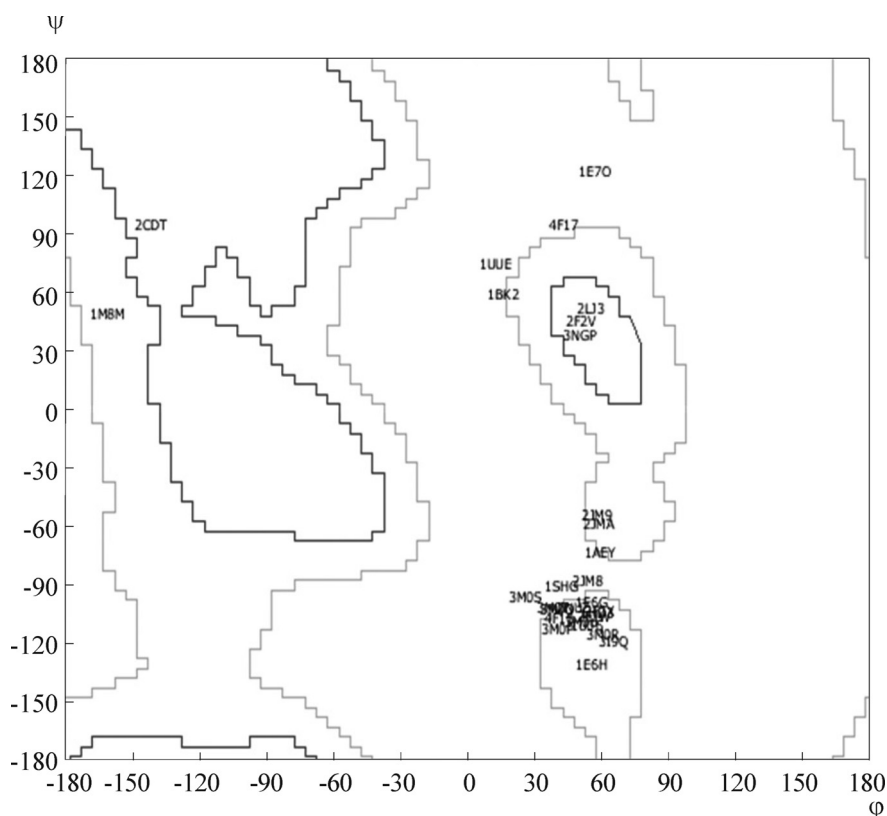


Рис. 4. Карта Рамачандрана для конформаций 47-го остатка всех 30 α -спектринов из банка PDB. Значения двугранных углов даны в градусах.

полипептидной цепи, надо учитывать угол ω_{48-49} и угол Ψ_{48} .

Как и в случае перебора по сетке, так и в случае минимизации целевой функции в качестве меры корректности замыкания цикла использовалась полусумма расстояний между рассчитанными по направлению полипептидной цепи и в противоположном направлении позициями атома C' 47-й аминокислоты и атома N 48-й аминокислоты.

Углы Φ и Ψ сканировались в диапазоне от -180° до 180° , а углы ω – в диапазоне $\pm 10^\circ$ от состояния, полученного на основе рентгеноструктурных данных. Перебор по всем углам велся с шагом в один градус. Для минимизации использовалась функция `fsolve`, реализующая алгоритм Поуэла [13], которая осуществляет поиск нуля для функции общего вида. Она входит в пакет функций для научных вычислений SciPy и NumPy для языка программирования Python 2.7. Для графического представления структуры белка в работе использовалась программа PyMOL [14]. Для построения карт Рамачандрана была применена программа Gnuplot [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы нашли все α -спектрины, содержащиеся в банке PDB. Конформации 47-го остатка дистальной β -шпильки SH3-домена 30 найденных белков были нанесены на карту Рамачандрана (рис. 4).

Затем были отобраны те структуры, в β -изгибе дистальной β -шпильки которых имеется аномальная конформация. Их оказалось 21. В табл. 1 для этих структур указан PDB-идентификатор и разрешение.

Конформации 47-остатка этих белков показаны на фрагменте карты Рамачандрана (правый нижний квадрант), соответствующем запрещенным конформациям (рис. 5).

Кроме двугранных углов Φ и Ψ , нас интересовали значения двугранных углов ω , характеризующих отклонение пептидных групп от плоскости. Это имеет принципиальное значение, так как метод Ведемейера и Шераги [12], с помощью которого можно вычислить значения зависимых параметров (соответствующих двугранных углов), справедлив только в предположении планарности пептидных групп.

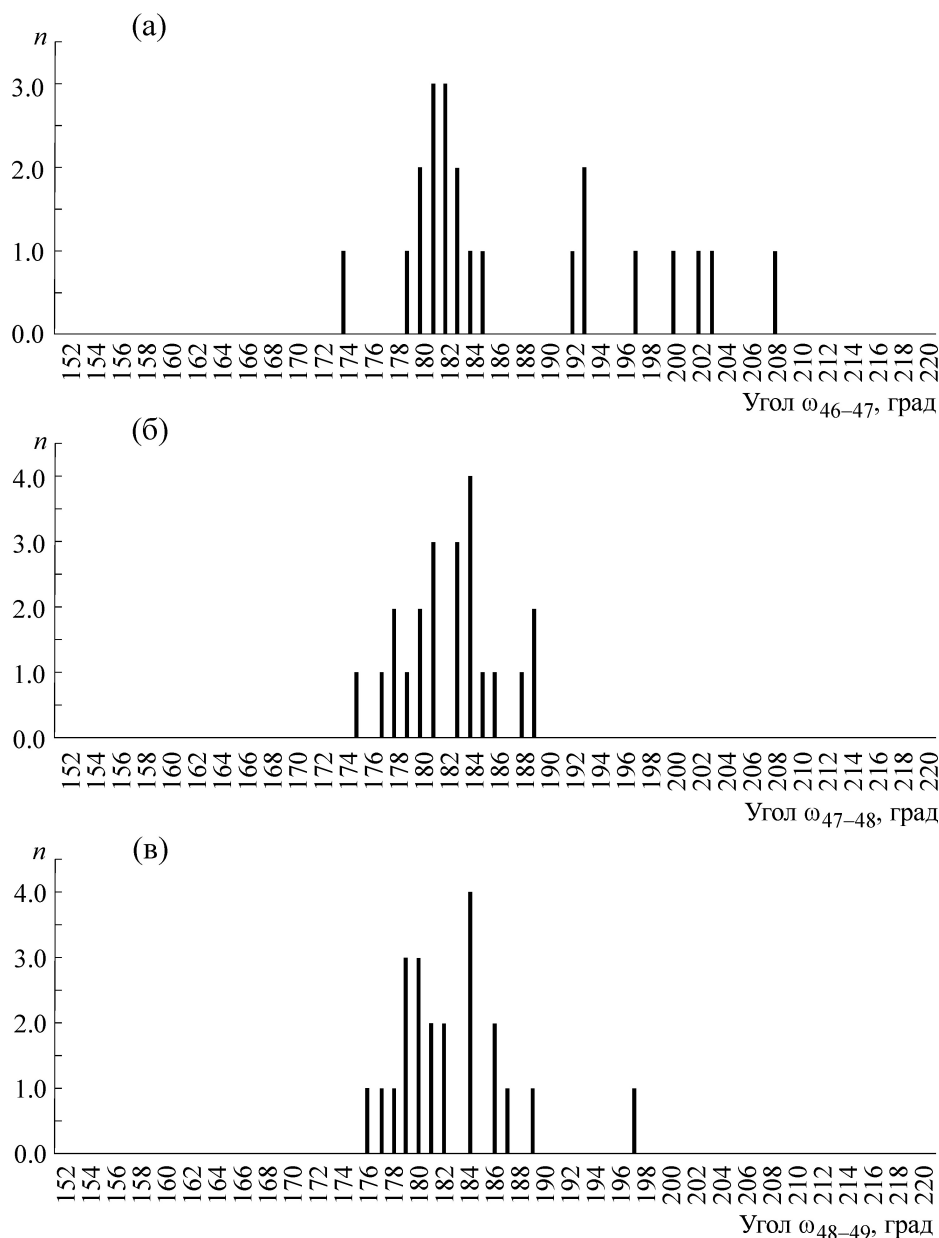


Рис. 6. Гистограммы, иллюстрирующие распределение угла ω_{46-47} (а), ω_{47-48} (б) и ω_{48-49} (в) в спектринах из табл. 1.

В результате (табл. 5) мы смогли с большой точностью воспроизвести экспериментально определенные структуры, что, кроме всего прочего, свидетельствует о корректности разработанной процедуры замыкания линкера через β -изгиб.

Весьма существенно, что во всех случаях, кроме решения, соответствующего экспериментальным данным, получено еще одно решение: конформер по углам Φ_{48} , Ψ_{48} . Для ЗМОР это решение очень близко к первому решению, т.е. экспериментально наблюдаемому, в других случаях имеет место значительное отличие. Суще-

ствование второго решения указывает на необходимость более детального исследования энергетических и конформационных свойств «перекрученных» β -шпилек, в которых встречаются исследуемые запрещенные конформации.

Обсудим подробнее обнаруженное второе решение. Для структур 3I9Q, 1U06, 2F2W и 1PWT второе решение характеризуется близким к нулю значением угла Φ , что неприемлемо из-за возникающих в этом случае плохих ван-дер-ваальсовых контактов. Этим объясняется то, что полученные конформеры экспериментально не наблюдаются. Для структуры 1QKX

Таблица 3. Значения двугранных углов (см. рис. 3), задающих конформацию β -изгиба, полученные из координат структур табл. 1

PDB идентификатор	ω_{46-47} , град	Φ_{47}	Ψ_{47}	ω_{47-48} , град	Φ_{48}	Ψ_{48}	ω_{48-49} , град
3MOR	182,64	61,15	-114,32	189,4	-96,59	17,49	181,74
3MOU	185,33	52,11	-108,06	185,33	-107,42	142,14	177,08
3I9Q	174,03	66,25	-118,12	184,71	-89,62	-0,41	184,12
1U06	185,62	54,29	-109,73	189,31	-92,83	8,05	189,31
2F2X	181,57	59,79	-102,83	181,39	-112,52	16,08	179,88
3M0S	208,6	27,20	-95,42	186,85	-109,12	6,29	184,03
2F2W	182,3	58,04	-105,71	180,66	-113,00	9,52	179,91
3M0T	202,67	39,25	-101,31	183,56	-108,01	2,55	186,35
3M0Q	200,23	41,70	-101,59	184,55	-107,90	4,20	187,44
1PWT	187,04	57,49	-101,87	183,29	-118,31	13,25	177,25
1SHG	203,03	43,36	-90,10	188,62	-108,53	-10,27	184,61
1QKX	182,73	55,31	-121,65	178,13	-112,67	36,13	178,92
2NUZ	192,52	48,08	-100,50	183,56	-114,01	14,29	179,23
4F16	193,09	43,05	-105,98	183,98	108,78	24,65	177,93
1QKW	181,37	62,20	-108,1	181,57	-119,58	22,98	180,55
1E6H	179,67	56,32	-130,11	179,93	-101,59	36,32	182,31
1E6G	180,35	56,42	-98,08	181,76	-97,25	-45,29	181,91
3M0P	197,34	41,36	-111,72	184,75	-92,01	-10,67	189,63
1H8K	181,52	42,79	-116,36	178,84	-117,21	49,70	180,45
1AEY	180,16	60,12	-72,85	184,36	-150,93	11,59	197,14
2JM8	184,28	54,51	-87,14	175,34	-145,32	6,35	184,84

Примечание. Структуры ранжированы от более высокого разрешения к более низкому.

Таблица 4. Результаты проведенного полного перебора по двугранным углам (см. рис. 3) для сканирования с фиксированным шагом

PDB (разрешение)	ω_{46-47} , град	Φ_{47}	Ψ_{47}	ω_{47-48} , град	Φ_{48}	Ψ_{48}	ω_{48-49} , град	Невязка, Å	Среднеквадратичное отклонение (по углам)
3MOR (1,10 Å)	182,64	51,0	-111,0	189,4	-77,0	-5,0	181,74	0,3052	7,92
3I9Q (1,45 Å)	174,03	65,0	-118,0	174,03	-93,0	11,0	184,12	0,039	2,7975
1U06 (1,49 Å)	185,62	44,0	-106,0	189,31	-85,0	9,0	189,31	0,3504	3,3725
2F2W (1,70 Å)	182,3	50,0	-112,0	180,66	-98,0	8,0	179,91	0,9338	4,615
1PWT (1,77 Å)	187,04	45,0	-107,0	183,29	-99,0	12,0	183,29	0,9732	5,8975
1QKX (1,80 Å)	182,73	51,0	-120,0	178,13	-103,0	9,0	178,12	0,1995	7,2625
1SHG (1,80 Å)	203,03	33,0	-84,0	188,62	-106,0	-6,0	188,62	0,5142	3,145

второе решение близко к запрещенной конформации 47-го остатка, но значение угла Φ меньше характерных для запрещенных конформаций значений. Наконец, Φ_{48} и Ψ_{48} для структуры 1SHG попадают в разрешенную α -спиральную область. Следует отметить, что эта структура и структура 1QKX – худшие в списке в смысле разрешения, и двугранные углы для них могут быть определены недостаточно точно.

Наконец необходимо оценить степень «запрещенности» конформаций, соответствующих β -изгибу II'-типа, в нашем случае, естественно, для структур, расшифрованных с наилучшим разрешением. Валентные углы для конформации остатка Asn47 согласуются со значениями из стандартного набора валентных углов [18]. Мы рассчитали расстояния между атомами Asn47 и атомами, принадлежащими предыдущему и последующему остаткам. Надо отметить

Таблица 5. Результаты оптимизации по двугранным углам (см. рис. 3) с использованием данных табл. 4 в качестве стартовых точек

PDB-идентификатор	№ решения	ω_{46-47} , град	Φ_{47}	Ψ_{47}	ω_{47-48} , град	Φ_{48}	Ψ_{48}	ω_{48-49} , град	Невязка, Å	Среднеквадратичное отклонение (по углам)
3MOR	1	182,64	61,15	-114,32	189,4	-96,59	17,49	181,74	1,5903021e-05	0,001085788
3MOR	2	182,64	61,15	-114,32	189,4	-72,76	14,32	181,74	3,3717111e-05	0,001732039
3I9Q	1	174,03	66,25	-118,11	184,71	-8,67	-67,82	184,12	1,2291452e-05	0,002362183
3I9Q	2	174,03	66,25	-118,11	184,71	-89,61	-0,41	184,12	2,8499311e-05	0,002372774
1U06	1	185,62	54,29	-109,73	189,31	-92,83	8,04	189,31	2,6176126e-05	0,00312072
1U06	2	185,62	54,29	-109,73	189,31	-1,92	-62,46	189,31	1,3195006e-05	0,001059334
2F2W	1	182,3	58,03	-105,71	180,66	-112,9	9,52	179,91	1,5000220e-05	0,005697534
2F2W	2	182,3	58,03	-105,71	180,66	0,62	-89,25	179,91	3,0268507e-05	0,005862061
1PWT	1	187,04	57,49	-101,87	183,29	-118,31	13,25	177,25	3,6270163e-05	0,000491923
1PWT	2	187,04	57,49	-101,87	183,29	2,44	-83,91	177,25	2,5512722e-05	0,001009241
1SHG	1	203,03	43,35	-90,10	188,62	-108,52	-10,27	184,61	1,4755620e-05	0,004405921
1SHG	2	203,03	43,35	-90,10	188,62	-21,87	-80,4	184,61	2,7471148e-05	0,004563607
1QKX	1	182,73	55,31	-121,65	178,13	-112,67	36,12	178,92	3,1417707e-05	0,002998959
1QKX	2	182,73	55,31	-121,65	178,13	26,24	-90,52	178,92	1,0825642e-05	0,002905947

напряженные ван-дер-ваальсовы контакты между C' Asn47 и C' предыдущего остатка (3,09 Å), между C_{β} Asn47 и C' предыдущего остатка (3,13 Å), между C' Asn47 и C' последующего остатка (3,08 Å). Но наиболее значимым, как представляется, является укороченный контакт между C_{β} Asn47 и N следующей аминокислоты (2,67 Å). В работе [5], как было процитировано выше, расстояние между этими атомами увеличивается за счет раскрытия соответствующего валентного угла от 2,65 Å до 2,71 Å. Как видно, мы подобного увеличения не наблюдаем. Авторы работы [5] видят напряженный контакт между O предыдущего остатка и C_{β} Asn47 (3,06–3,09 Å). Мы не наблюдаем в этом случае укороченного расстояния (3,23 Å).

Полученные результаты позволяют утверждать, что существует определенный тип локальной конформации остова полипептидной цепи, который не зависит от последовательности аминокислот, но определяется топологическими условиями, предопределяющими формирование структуры. Обращает на себя внимание то, что определенность формы изученных β -изгибов вообще не требует рассмотрения боковых радикалов. Конформационная определенность возникает как следствие фиксации двух аминокислотных остатков β -шпильки, непосредственно примыкающих к β -изгибу. После этого все четыре остатка (два в шпильке и два в изгибе) приобретают определенную форму или конфор-

мацию. Поэтому имеет смысл говорить о новом типе конформационно-стабильных пептидов. Конформационно-стабильные пептиды на уровне тетрапептидов были изучены в работе [19]. В работах [20,21] были обнаружены и исследованы конформационно-стабильные пептиды α -спиральной природы.

Итак, сформулированная нами идея, состоящая в том, что запрещенная конформация «навязывается» β -изгибу фиксацией примыкающих к нему остатков, подтверждается результатами проведенного конформационного анализа. Топологические ограничения в контексте структуры в β -шпильках II'-типа исключают разрешенные локальные конформации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 14-04-00639 и 14-04-90034-Бел_а), гранта Б14Р-178 и Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, and V. Sasisekharan, *J. Mol. Biol.* **7**, 95 (1963).
2. K. Gunasekaran, C. Ramakrishnan, and P. Balaram, *J. Mol. Biol.* **264**, 191 (1996).
3. E. G. Hutchinson and J. M. Thornton, *Protein Sci.* **3**, 2207 (1994).
4. B. Madan, S. Y. Seo, and S.-G. Lee, *Proteins* **82** (9), 1721 (2014).

5. D. S. Berkholz, M. V. Shapovalov, R. L. Dunbrack, Jr. and P. A. Karplus, *Structure* **17**, 1316 (2009).
6. J. Tsai, M. Levitt, and D. Baker, *J. Mol. Biol.* **291**, 215 (1999).
7. A. R. Viguera, M. A. Jimenez, M. Rico, and L. Serrano, *J. Mol. Biol.* **255**, 507 (1996).
8. I. Torshin, N. G. Esipova, and V. G. Tumanyan, *J. Biomol. Struct. Dynam.* **32** (2), 198 (2014).
9. M. C. Vega, J. C. Martinez, and L. Serrano, *Protein Sci.* **9**, 2322 (2000).
10. N. Go and H. A. Scheraga, *Macromolecules* **3**, 178 (1970).
11. N. Go and H. A. Scheraga, *Macromolecules* **6**, 273 (1973).
12. W. J. Wedemeyer and H. A. Scheraga, *J. Comput. Chem.* **20** (8), 819 (1999).
13. R. Fletcher and M. J. D. Powell, *Computer J.* **6** (2), 163 (1963).
14. W. L. DeLano, PyMol: An Open-Source Molecular Graphics Tool CCP4. Newsletter on Protein Crystallography No 40 (2002).
15. J. Racine, *J. Applied Econometrics* **21** (1), 1133 (2006).
16. S. S. Shapiro and M. B. Wilk, *Biometrika* **52** (3/4), 591 (1965).
17. P. Royston, *Applied Statistics* **44**, 547 (1995).
18. C. Ramakrishnan and G. N. Ramachandran, *Biophys. J.* **5** (6), 909 (1965).
19. А. В. Батяновский и П. К. Власов, *Биофизика* **53**, 556 (2008).
20. А. В. Батяновский, Н. Г. Есипова и С. Э. Шноль, *Биофизика* **54**, 1137 (2009).
21. А. В. Батяновский, В. А. Намиот, И. В. Филатов и др., *Биофизика* **58**, 1069 (2013).

Disallowed Conformations of Polypeptide Chain Exemplified by the β -Bend of the β -Hairpin in the α -Spectrin CH3-Domain

L.A. Uroshlev*, I.Yu. Torshin**, A.V. Batyanovskii***,
N.G. Esipova*, and V.G. Tumanyan*

*Engelhard Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia;

**Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/3, Moscow, 119991 Russia

***Institute of Cell Biophysics and Cell Technology, National Academy of Sciences of Belarus,
ul. Akademicheskaya 27, Minsk, 220072 Belarus

The work presents the results of an exhaustive conformational analysis of β -turns involving amino acid residues with disallowed backbone conformation of the polypeptide chain. It is known that the first residue of the β -turn (Asn47) of the distal β -hairpin in the α -spectrin SH3-domain is characterized by sterically disallowed main chain conformation (values of the dihedral angles Φ and Ψ are in the right bottom quadrant of the Ramachandran plot). All α -spectrin structures with the anomalous elements deposited in the PDB were analysed. We hypothesized that the formation of disallowed conformation may occur through the fixation (due to the SH3 domain structure) of the adjacent to the β -turn amino acid residues with the β -structure. These residues are disposed in such a manner that β -turn conformation of the residues contributes just to the disallowed local conformation of this residue whereas any other β -turn conformations (with allowed local conformation) are impossible. To test this hypothesis an exhaustive conformational analysis of the β -bend has been performed by altering internal coordinates (two pairs of Φ and Ψ angles and two ω angles). The conformations were selected as a result of grid search procedure with 1° step that corresponded to stereochemically allowed local deformations of the polypeptide chain segment forming the β -turn. In all conformations obtained the local conformation of Asn47 rests in the disallowed region. The conformations found include conformations coinciding with experimentally determined structures from the PDB as well as an additional variant that differs from X-ray structure in values of a pair of Φ and Ψ angles of the second residue belonging to the β -bend. Values of these angles fall in the region of the Ramachandran plot near the line $\Phi = 0$ (and negative values of Ψ) i.e. in strongly disallowed region without experimental points. Therefore the additional variants of the β -turn local deformation are impossible to observe in experiment. Thus, the idea that disallowed conformation is intruded to the β -bend by fixation of adjacent residues receives confirmation in this work. The topological limitations in a context of the structure in such kind of β -hairpins exclude the allowed local conformations.

Key words: SH3 domain, disallowed conformations, β -turn, conformational analysis