

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ N- И C-КОНЦЕВЫХ ДОМЕНОВ ПРИ АВТОИНГИБИРОВАНИИ И АКТИВАЦИИ ФОРМИНА mDia1

© 2015 г. И.А. Оршанский, А.В. Попинако*, А.Д. Коромыслова**,
О.И. Волох***, К.В. Шайтан****, О.С. Соколова***

ЗАО «Байер», 107113, Москва, 3-я Рыбинская ул., 18/2;

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33/2;

**Университет Гейдельберга, 69117, Гейдельберг, Грабенгассе, 1, Германия;

***Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/12;

****Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: sokolova184@gmail.com

Поступила в редакцию 07.04.15 г.

Методом управляемой молекулярной динамики были определены пары аминокислотных остатков на поверхности взаимодействующих доменов формина mDia1: DID-DAD, контролирующего автоингибирование формина и DID с ГТФазой Rho, отвечающих за активацию. Наиболее стабильными являются ионные взаимодействия между остатками Glu178 и Arg248, а также гидрофобные взаимодействия атома углерода Thr175 с ароматическим кольцом Phe247. Взаимодействия DID с Rho оказались наиболее сильными. Они опосредованы специфическими тройными ионными взаимодействиями между положительно заряженными аминокислотами из Rho и триплета аминокислот в составе домена DID, состоящего из двух отрицательно заряженных аминокислот, разделенных одной незаряженной. Сайты связывания домена DID с Rho и DAD частично перекрываются, но во взаимодействиях с различными партнерами принимают участие различные аминокислоты DID. Обсуждаются возможные конформационные изменения доменов формина при активации и инактивации.

Ключевые слова: актинсвязывающие белки, формин, молекулярная динамика, DID, DAD, Rho-ГТФаза.

Многие клеточные процессы, такие как перемещение клеток, цитокинез, поддержание полярности клетки, везикулярный транспорт, морфология и иммунные реакции происходят благодаря работе актинового цитоскелета [1,2]. Актиновые филаменты – это полярные структуры, характеризующиеся быстрорастущим оперенным концом и медленно растущим заостренным концом. Рост филаментов регулируется внеклеточными раздражителями, которые активируют сигнальный каскад реакций. К таким сигнальным молекулам относится Rho-ГТФаза (Rho).

В данном исследовании изучали работу ключевого актинсвязывающего белка формина mDia1, контролирующего формирование *de novo* актиновых филаментов. В клетке формин находится в автоингибированном состоянии [3,4]. Автоингибирование обусловлено внутримолекулярными взаимодействиями между N-

концевым регуляторным участком формина: Diaphanous Inhibitory Domain (DID) и его консервативным C-концевым сегментом, называемым Diaphanous Autoregulatory Domain (DAD) [5,6]. Автоингибирование было продемонстрировано в экспериментах по совместной экспрессии изолированных N- и C-концевых фрагментов молекулы формина [5,7,8].

Активация формина происходит при связывании Rho-ГТФазы с GBD-доменом формина [5,8,9]. С помощью ЯМР и биохимических экспериментов было выявлено, что области контактов DID-Rho и DID-DAD частично перекрываются, что позволило предположить наличие механизма конкурентного связывания [7,10]. В результате связывания с Rho формин изменяет свою конформацию и пространственное расположение доменов таким образом, что оказывается возможным взаимодействие формина с мономерами актина и формирование полимерной цепи актина [11]. Ранее Отомо и Роуз с соавторами получили кристаллическую

Сокращения: Rho – Rho-ГТФаза; МД – молекулярная динамика; УМД – управляемая молекулярная динамика.

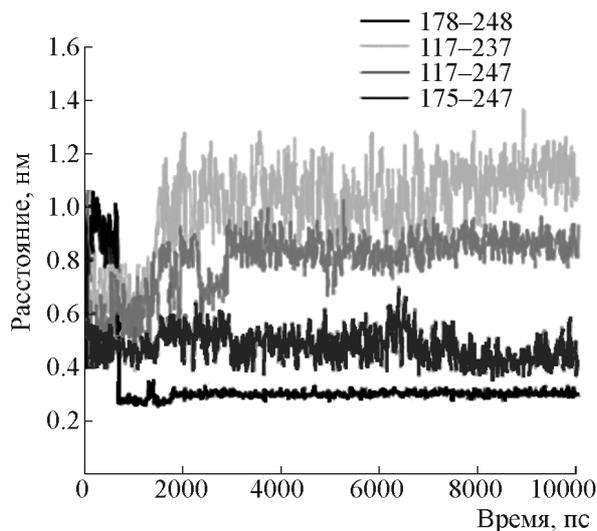


Рис. 1. Молекулярная динамика DID-DAD-комплекса в течение 10 нс. Расстояния между парами остатков на поверхности взаимодействия DID-DAD.

структуру изолированного N-терминального участка DID [9], а также его структуру в составе комплекса с Rho [10]. Однако в кристаллической структуре возможно искаженное расположение некоторых поверхностных аминокислот, обусловленное упаковкой белка в кристаллической решетке. Следовательно, свойства междоменных взаимодействий, определяемые поверхностными аминокислотами, представляют собой особый интерес для молекулярного моделирования и проведения численных экспериментов.

Таким образом, предметом данного исследования явилось взаимодействие в комплексах DID-DAD и DID-Rho и роль специфических аминокислот на взаимодействующих поверхностях. Методом молекулярной динамики (МД) исследована роль отдельных аминокислотных остатков в составе доменов формина: DID и DAD, участвующих в образовании стабильных комплексов при автоингибировании и активации формина с помощью Rho-ГТФазы. Была проведена оценка стабильности комплексов, выделены предполагаемые типы взаимодействий.

МЕТОДЫ

Объекты исследования. Кристаллическая структура комплекса DID-Rho мыши (pdb code: 1Z2C), кристаллическая структура комплекса DID-DAD мыши (pdb code: 1F31).

Молекулярная динамика. *Параметры метода.* Для расчетов использовали программный пакет Gromacs 3.3, силовое поле OPLS-AA/L.

Расчетная длина траектории 10 нс (1 нс для релаксации), шаг интегрирования – 1 фс. Расчеты проводили в периодической ячейке при использовании стохастической динамики в качестве термостата (поддерживаемая температура 300 К). Алгоритм расчета – Leapfrog.

Релаксация. Источником начальных структур являлись молекулярные структуры, полученные методом кристаллографии (pdb code: 1F31 для структуры комплекса DID-DAD и 1Z2C для структуры комплекса DID-Rho). Исходная структура изначально релаксировалась. К отрелаксированной структуре применяли управляемую молекулярную динамику (УМД).

Управляемая молекулярная динамика. Данный метод применяли для оценки прочности взаимодействия между доменами, а также определения ключевых точек для взаимодействия.

В протоколе УМД центр масс домена DID фиксировали, а к центру домена масс DAD или Rho применяли силу, направленную по нормали к плоскости контакта доменов. Сила была постоянной в каждом эксперименте. Между сериями экспериментов сила увеличивалась с шагом 70 ккал/(моль·Å).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Взаимодействия в комплексе DID-DAD. На первом этапе проводили МД в течение 1 нс для релаксации кристаллической структуры мышинового комплекса DID-DAD, полученной из базы данных белковых структур Protein Data Bank (pdb code 1F31). После релаксации анализировали образование устойчивых ионных и гидрофобных взаимодействий между отдельными аминокислотами. Было выделено четыре пары аминокислотных остатков, взаимодействие между которыми стабилизировало комплекс DID-DAD: A117_{DID}-F247_{DAD}; A117_{DID}-L237_{DAD}; E178_{DID}-R248_{DAD}; T175_{DID}-F247_{DAD}. Данные аминокислотные остатки находились друг от друга на расстоянии менее 1 нм.

С помощью метода МД проводили численный эксперимент, затем на основании полученной траектории оценивали изменение расстояния между аминокислотными остатками (рис. 1). Согласно полученным данным наиболее сильные взаимодействия наблюдали между E178_{DID} и R248_{DAD}, T175_{DID} и F247_{DAD}, A117_{DID} и F247_{DAD}. При этом E178_{DID} и R248_{DAD} образуют ионную связь, а A117_{DID}-F247_{DAD} и T175_{DID}-F247_{DAD} определены гидрофобными взаимодействиями.

Для исследования роли отдельных аминокислот в стабилизации DID-DAD поверхности

мы применили УМД. Центр масс домена DID фиксировали, и к центру масс домена DAD прилагали различные силы. Приложение сил величиной 1–70 ккал/(моль·Å) показало отсутствие существенного увеличения расстояния между центрами масс DID- и Rho-доменов (данные не представлены). Критическое значение приложенной силы было достигнуто уже при 80 ккал/(моль·Å): комплекс DID-DAD полностью диссоциировал после 1,3 нс УМД (рис. 2). Были выделены аминокислоты, участвующие в междоменном взаимодействии при значительных конформационных изменениях DAD-домена E178_{DID}-R248_{DAD}, T175_{DID}-F247_{DAD}.

Взаимодействия в комплексе DID-Rho. При исследовании кристаллической структуры комплекса DID-Rho из mDial (pdb code 1Z2C) [10] были показаны следующие пары взаимодействующих аминокислот: Y66_{Rho}-K108_{GBD}; Q63_{Rho}-K108_{GBD}; V38_{Rho}-P103_{GBD}; E40_{Rho}-K107_{GBD}; D67_{Rho}-N164_{DID}; D67_{Rho}-N165_{DID}. С применением метода МД было показано, что наиболее стабильные взаимодействия формируются между следующими парами остатков: D67_{Rho}-N164_{DID}, E40_{Rho}-K107_{GBD}, V38_{Rho}-P103_{GBD} (рис. 3). Следовательно, основу формирования DID-Rho-комплексов составляют гидрофобные и ионные взаимодействия.

Метод УМД применяли для исследования взаимодействий между специфическими аминокислотными остатками, стабилизирующими комплекс по принципу «молекулярных замков». При этом фиксировали центр масс DID-домена и силы различной величины прикладывали к центру масс Rho. Взаимодействие между доменом DID и ГТФазой Rho оказалось значительно сильнее, чем между доменами DID и DAD. Приложение сил от 1 до 399 ккал/(моль·Å) не показало существенного увеличения расстояния между центрами масс домена DID и Rho (данные не представлены). Приложение силы 400–500 ккал/(моль·Å) позволило определить два ключевых участка, где взаимодействия были наиболее сильными. В каждом из них были впервые отмечены тройные ионные взаимодействия.

Первый ключевой участок образован в результате взаимодействия положительно заряженного K133_{Rho} и отрицательно заряженных E427_{DID} и E429_{DID}. Во втором ключевом участке ионное взаимодействие формируют положительно заряженный R68_{Rho} и отрицательно заряженные N253_{DID} и N255_{DID} (рис. 4).

Данные тройные комплексы, согласно данным УМД, являются наиболее стабильными и взаимодействуют на протяжении достаточно

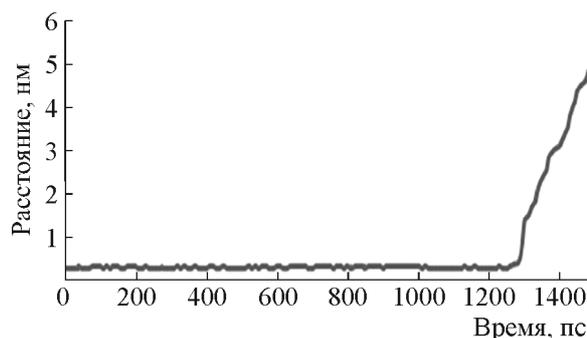


Рис. 2. Расстояние между DID-DAD-доменами при приложении силы 80 ккал/(моль·Å).

долгого времени, после того как все остальные взаимодействия диссоциируют (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Специфическое взаимодействие N-концевого домена формина DID с его C-концевым доменом DAD при автоингибировании считается широко известным фактом, однако механизм взаимодействия является предметом дискуссий. Ламмерс с коллегами [7] предположили, что аминокислотные остатки DAD F247 и M234 являются ключевыми и приносят основной вклад во взаимодействие с DID. МД-исследование подтвердило роль F247_{DAD} — остаток гидрофобно взаимодействует с T175_{DID} и с A117_{DID}. Однако мы не выявили участия M234_{DAD} во взаимодействии с DID. Дополнительно мы определили еще одну пару взаимодействующих аминокислот: E178_{DID} и R248_{DAD}. На основании сравнения стабильности структур в экспериментах по УМД можно сделать вывод, что комплекс DID-DAD является менее стабильной структурой, что соответствует экспериментальным данным, демонстрирующим быстрый распад комплекса DID-DAD при активации молекулы формина [3,4].

В отличие от ингибиторного комплекса DID-DAD, взаимодействия DID с активатором Rho значительно сильнее. Роуз с коллегами на основе анализа кристаллической структуры DID-Rho предположили, что основную роль в образовании комплекса играют гидрофобные взаимодействия [10]. Наши эксперименты по УМД показали, что основные контакты, стабилизирующие структуру DID-Rho, образованы тройными взаимодействиями, имеющими электростатическую природу. Каждое такое взаимодействие включает три аминокислоты: положительно заряженную из Rho (K или R), взаимодействующую с триплетом аминокислот в составе домена DID, состоящего из двух заря-

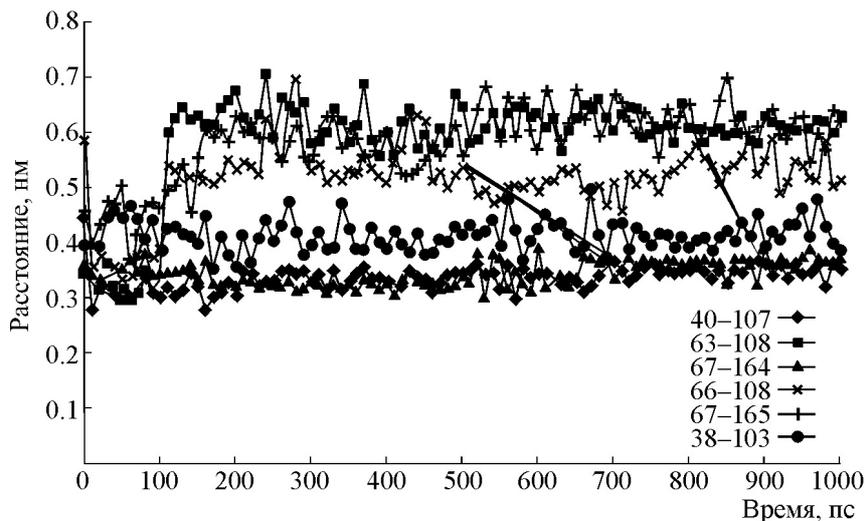


Рис. 3. Молекулярная динамика DID-Rho-комплекса в течение 10 нс. Расстояния между парами остатков на поверхности взаимодействия DID-Rho.

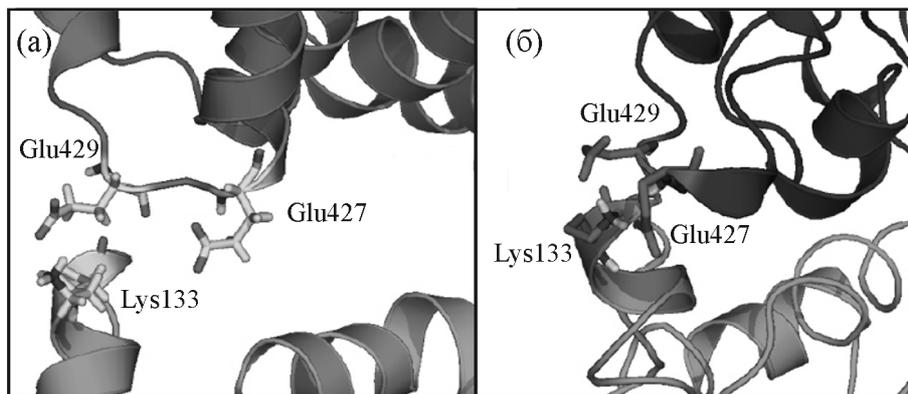


Рис. 4. Образование тройного ионного взаимодействия на поверхности взаимодействия DID и Rho. (a) – Кристаллическая структура комплекса DID-Rho до релаксации, (б) – после релаксации в течение 10 нс (взаимодействующие спирали доменов: DID – сверху, Rho – снизу).

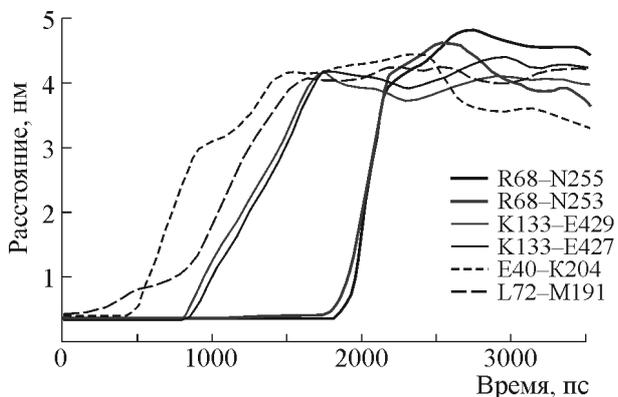


Рис. 5. Изменение расстояния между парами остатков на поверхности взаимодействия Rho и DID при приложении силы 400 ккал/(моль·Å). Тройные взаимодействия отмечены непрерывными линиями.

женных аминокислот (N или E), разделенных незаряженной (X) – NXN или EXE. Такие взаимодействия оказались очень прочными и нарушить их можно только при приложении силы, превышающей физиологические значения. Возможной причиной является формирование стабильных ионных комплексов, которые взаимодействуют сильнее, чем пары аминокислотных остатков. Было бы интересно в дальнейшем проследить формирование подобных комплексов на контактирующих поверхностях других белок-белковых комплексов.

Имеющаяся на сегодняшний день рабочая гипотеза физиологического обновления формина в клетке [3] предполагает, что в цитоплазме он находится в аутоингибированном состоянии. Для того чтобы перевести его в активное состояние, необходимо взаимодействие с факто-

рами, способствующими нуклеации, Rho ГТФазой и липидами [5,8,9].

Сайты связывания DID с RhoA и DAD значительно перекрываются [5]. Наши исследования показали, однако, что во взаимодействии с различными доменами принимают участие разные аминокислоты DID. Это означает, что при активации формина Rho может вначале взаимодействовать с GBD, а потом конкурирующие взаимодействия вытесняют домен DAD, и его сайт связывания оккупируется Rho, что приводит к стабильному активированному состоянию. Это состояние фиксируется тройными ионными взаимодействиями (рис. 4б). В результате формин переходит в открытую конформацию; его актинсвязывающие сайты становятся доступны, это инициирует нуклеацию нового актинового филамента. Предполагается, что формин при этом может остаться связанным с плазмалеммой через Rho ГТФазу [12]. Подобная схема требует очень сильных взаимодействий для того, чтобы удержать растущий актиновый филамент. Обнаруженные нами в настоящем исследовании тройные ионные взаимодействия прекрасно справляются с подобной задачей. Для разрыва тройных взаимодействий формин должен претерпеть конформационное изменение, при этом взаимодействующие аминокислоты могут оказаться в положении, характерном для кристаллической структуры (рис. 4а). После отсоединения активатора Rho, формин может какое-то время оставаться на остром конце актинового филамента, кепируя его [6,11].

Будучи вытесненным кепирующими белками и/или другими факторами [13], формин снова может вернуться в цитоплазму в автоингибированном состоянии, при этом DID-домен взаимодействует с DAD-доменом. Таким образом, активация формина *in vivo*, видимо, требует

совместного действия многих факторов и значительных конформационных изменений, подобно процессам, происходящим при нуклеации и активации сборки актинового филамента другим комплексом WASP-Arp2/3 [14].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-00234).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ю. М. Васильев, Соросов. образов. журн., № 2, 36 (1996).
2. S. H. Lee and R. Dominguez, *Mol. Cells* **29**, 311 (2010).
3. S. Maiti, A. Michelot, C. Gould, et al., *Cytoskeleton (Hoboken)* **69**, 393 (2012).
4. T. Otomo, D. R. Tomchick, C. Otomo, et al., *PLoS One* **5** (9) pii: e12896 (2010).
5. A. G. Nezami, Poy F., and M. J. Eck, *Structure* **14**, 257 (2006).
6. J. B. Moseley, I. Sagot, A. L. Manning, et al., *Mol. Biol. Cell* **15**, 896 (2004).
7. M. Lammers, R. Rose, A. Scrima, and A. Wittinghofer, *EMBO J.* **24**, 4176 (2005).
8. F. Li and H. N. Higgs, *J. Biol. Chem.* **280**, 6986 (2005).
9. T. Otomo, D. R. Tomchick, C. Otomo, et al., *Nature* **433**, 488 (2005).
10. R. Rose, M. Weyand, M. Lammers, et al., *Nature* **435**, 513 (2005).
11. D. Pruyne, M. Evangelista, C. Yang, et al., *Science* **297**, 612 (2002).
12. A. Seth, C. Otomo, and M. K. Rosen, *J. Cell Biol.* **174**, 701 (2006).
13. M. Chesarone, C. J. Gould, J. B. Moseley, and B. L. Goode, *Dev. Cell* **16**, 292 (2009).
14. S. B. Padrick and M. K. Rosen, *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 707 (2010).

Molecular Dynamics of N- and C-terminal Interactions during Autoinhibition and Activation of Formin mDial

I.A. Orshanskiy*, A.V. Popinako**, A.D. Koromyslova***, O.I. Volokh****, K.V. Shaitan*****, and O.S. Sokolova*****

*SAO "Bayer", 3-ya Rybinskaya ul. 18/2, Moscow, 107113 Russia

**Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 33/2, Moscow, 119071 Russia

***University of Heidelberg, Grabengasse 1, Heidelberg, 69117 Germany

****Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

*****Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

With the method of molecular dynamics, pairs of amino acid residues have been identified on the surface of the interacting formin mDial domains: DID-DAD, which are responsible for the autoinhibition of formin, and the GTPase Rho-DID domain, and control activation. It was found that the most stable interactions are ionic interactions between Glu178 residue and Arg248 residue, as well as hydrophobic interactions between Thr175 and Phe247. The strongest interactions proved to be between the DID domain with Rho-GTPase. These interactions are mediated by specific triple ionic interactions between positively charged amino acid in Rho, and a triplet of amino acids in DID, consisting of two negatively charged amino acids, separated by one uncharged. Binding sites for Rho-GTPase and DAD partially overlap, but various amino acids on the DID participate in interactions with different domains. We discuss the possible conformational changes in formin domains during activation and inactivation.

Key words: actin-binding proteins, formin, molecular dynamics, DID, DAD, Rho-GTPase