

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОРИНОВ *Yersinia ruckeri* МЕТОДАМИ ОПТИЧЕСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

© 2016 г. Г.Н. Лихацкая, Д.К. Чистюлин, Н.Ю. Ким, В.А. Хоменко, О.Ю. Портнягина, Т.Ф. Соловьева, О.Д. Новикова

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,  
690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159

E-mail: galin56@mail.ru

Поступила в редакцию 31.10.15 г.

Методами оптической спектроскопии и молекулярного моделирования изучена пространственная организация поринов наружной мембраны. Обнаружено, что OmpF- и OmpC-порины *Y. ruckeri* представляют собой  $\beta$ -структурные мембранные белки, подобные порообразующим белкам других грамотрицательных бактерий. Методами структурной биоинформатики построены модели пространственных структур мономеров и тримеров OmpC- и OmpF-поринов *Y. ruckeri*. Обнаружено, что в стабилизации структуры более термостабильного тримера OmpF-порина участвует большее количество водородных и гидрофобных связей. Показано, что основные различия пространственных структур исследуемых поринов наблюдаются в строении внешних петель поринов. В молекулах OmpC- и OmpF-поринов *Y. ruckeri* присутствуют три остатка триптофана. Методом молекулярной динамики показано, что доступность растворителю остатка Trp212 OmpF-порина увеличивается в два раза при термоденатурации порина, а доступность растворителю остатка Trp184 OmpC-порина не увеличивается. Предполагается, что «красный» сдвиг триптофановой флуоресценции OmpF-порина при термоденатурации обусловлен поведением остатка Trp212.

*Ключевые слова:* *Yersinia ruckeri*, порообразующие белки, пространственная структура, оптическая спектроскопия, молекулярное моделирование.

Бактерии рода *Yersinia* играют существенную роль в инфекционной патологии человека. Этим объясняется внимание исследователей к изучению антигенов, входящих в состав наружной мембраны данных микроорганизмов, в частности порообразующих белков. Бактериальные порины – интегральные мембранные  $\beta$ -структурные белки, образующие поры для пассивной диффузии гидрофильных молекул через наружную мембрану [1]. Локализация в бактериальной клетке и особенности структуры обуславливают наличие у поринов и других функций, отличных от транспортной. Например, известно, что одним из наиболее эффективных механизмов адаптации бактерий к условиям окружающей среды является изменение проницаемости наружной мембраны. Это осуществляется под воздействием внешних факторов за счет регулирования биосинтеза близкородствен-

ных белков с различным диаметром пор (OmpF- и OmpC-поринов) [2,3].

Модуляция экспрессии порообразующих белков происходит следующим образом: в условиях низкой осмолярности доминирующим белком в наружной мембране является OmpF-порин. Напротив, при увеличении концентрации солей в среде происходит репрессия гена *ompF*, и OmpC-белок становится основным (в количественном отношении) порином наружной мембраны бактерий. В случае иерсиний экспрессия неспецифических поринов разных типов регулируется также температурой, поскольку эти бактерии обладают широкими адаптационными возможностями и могут существовать как в паразитическом, так и в сапрофитическом состояниях [4]. В связи с этим порины иерсиний являются перспективным объектом для сравнительного изучения структурно-функциональных особенностей неспецифических порообразующих белков грамотрицательных бактерий. Ранее, на примере OmpF- и OmpC-белков некоторых патогенных и непато-

Сокращение: КД – круговой дихроизм.

генных для человека видов иерсиний, мы показали, что эти белки, несмотря на высокую степень гомологии (до 80%), имеют различные физико-химические свойства, в частности молекулярную массу и термостабильность [5–7]. Изменение термостабильности, одной из основополагающих характеристик белка, как правило, связано с незначительными структурными изменениями, ведущими к оптимизации стабилизирующих молекулу гидрофобных и/или гидрофильных взаимодействий. Однако при сравнении белков мезофильных и термофильных организмов были обнаружены не только модификации в их структуре, направленные на увеличение термостабильности, но и вариации, обусловленные принадлежностью к определенному виду [8].

Данная работа посвящена изучению особенностей пространственной структуры неспецифических поринов *Y. ruckeri* разных типов методами оптической спектроскопии и молекулярного моделирования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение OmpF- и OmpC-поринов *Y. ruckeri*.** В работе использовали штамм КММ 821 *Y. ruckeri*. Бактериальные клетки культивировали, как описано в работе [9]. Для получения OmpF- и OmpC-поринов использовали микробную массу, выращенную соответственно при 4 и 37°C. Выделение и очистку поринов проводили согласно процедуре, описанной в работе [9].

**Оптические методы. Приготовление образцов поринов.** В работе использовали образцы поринов в 0,25% растворе додецилсульфата натрия в концентрации 50, 150 и 300 мкг/мл. Концентрацию белка в растворе определяли по УФ-спектрам в максимуме поглощения при 280 нм, принимая  $A_{1\text{см}}^{0.1\%}$  равной 1,0. УФ-спектры регистрировали при 20°C на спектрофотометре CecilCE 7200 (Aquarius, Англия) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см.

**Спектры кругового дихроизма (КД) поринов** регистрировали на спектрополяриметре Jasco-500A (Jasco, Япония) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 0,1 см для пептидной области спектра и 1 см – для ароматической, как описано в работе [9]. Расчет элементов вторичной структуры проводили с помощью пакета программ CDPro [10].

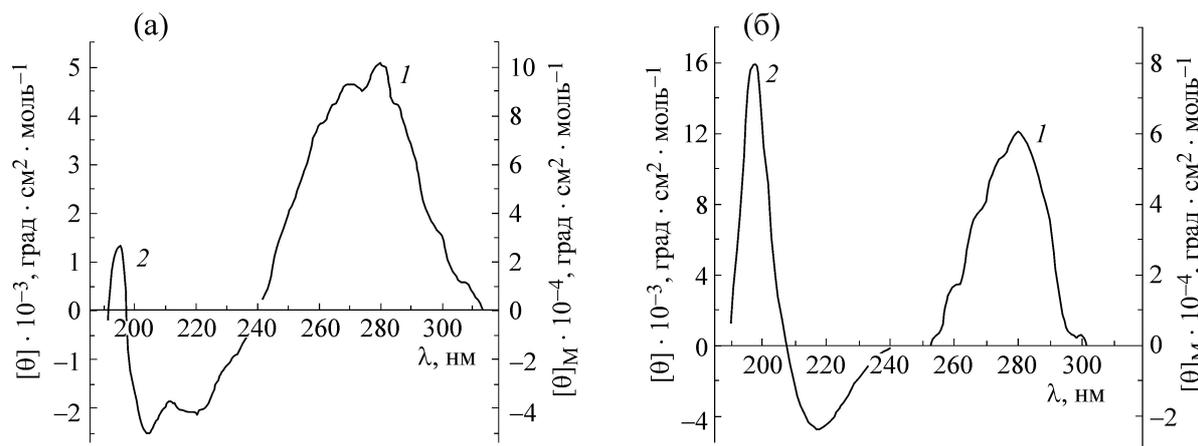
**Спектры флуоресценции** поринов измеряли на спектрофлуориметре Hitachi 850 (Япония) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см. Возбуждение флуоресценции проводили

светом с длинами волн 280 и 296 нм. Спектры флуоресценции, скорректированные по родамиду В (Wako Pure Chemical Industries, Япония), регистрировали, вычитая рамановскую полосу буферного раствора. Спектральная ширина щелей монохроматоров возбуждения и излучения составляла 5 нм. Разложение экспериментальных спектров на компоненты, соответствующие излучению спектральных форм остатков триптофана в белке [11], проводили, используя программу оптимизации, основанную на методе Маркуардта [12].

**Построение теоретических моделей поринов.** В работе использовали аминокислотные последовательности поринов *Y. ruckeri*: OmpF (код Uniprot E2FHC9) [13] и OmpC [9], которая идентична последовательности с кодом Uniprot C4UFZ3. Анализ последовательностей проведен с помощью модуля поиска прототипов программы MOE 2014.09 [14]. Для поринов *Y. ruckeri* в качестве прототипа была выбрана кристаллическая структура осмопорина (Ompk36) *Klebsiella pneumoniae* (код PDB 1OSM) [15]. Теоретические модели тримеров OmpC- и OmpF-поринов *Y. ruckeri* построены и оптимизированы с помощью программы MOE 2014.09 [14] с использованием в качестве прототипа кристаллической структуры тримера осмопорина (Ompk36) *K. pneumoniae*. После 3D-протонирования окончательной модели проводили оптимизацию структуры молекулы методом минимизации энергии с потенциалом сил Amber12:ЕНТ. Изучение термоденатурации OmpC- и OmpF-поринов *Y. ruckeri* методом молекулярной динамики при температуре 370 К в течение 1 нс проводили с помощью программы GROMACS 5.0 [16] с использованием оборудования ЦКП «Дальневосточный вычислительный ресурс» ИАПУ ДВО РАН. Молекулярно-динамическую симуляцию структуры поринов проводили при постоянной температуре с использованием потенциала сил Amber99sb-ildn.ff, термостата Берендсена и баростата Парринелло–Рахмана в периодичных граничных условиях и явно заданном растворителе. Пространственные структуры неспецифических OmpC- и OmpF-поринов *Y. ruckeri* использовали для расчета содержания элементов вторичной структуры с помощью программы MOE 2014.09 [14].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Сравнительный анализ пространственной структуры OmpF- и OmpC-поринов *Y. ruckeri* методами оптической спектроскопии.** Для характеристики пространственной организации



**Рис. 1.** Спектры КД поринов OmpF (а) и OmpC (б) *Y. ruckeri* в ближней (250–300 нм) УФ-области (кривые 1) и дальней (190–240 нм) УФ-области (кривые 2).

исследуемых белков в растворе использовали методы оптической спектроскопии: круговой дихроизм и собственную белковую флуоресценцию. Для солиubilизации образцов поринов использовали 0,25% раствор додецилсульфата натрия, в котором, как было показано ранее [17], не происходит денатурации OmpF-пориона из псевдотуберкулезного микроба.

**Круговой дихроизм.** Спектр КД OmpF-пориона в ближней УФ-области (240–310 нм), области поглощения остатков ароматических хромофоров и дисульфидных связей, имеет достаточно выраженную тонкую структуру, обусловленную остатками фенилаланина в области 260–270 нм, остатками тирозина в области 275–285 нм и триптофана в области 285–305 нм (рис. 1а, кривая 1).

В спектре КД OmpC-пориона в этой УФ-области те же характеристичные полосы менее выражены и имеют меньшую эллиптичность (рис. 1б, кривая 1). Полученные данные указывают на то, что третичная структура OmpF *Y. ruckeri* более жестко фиксирована в этих условиях, нежели структура OmpC-белка.

Спектры КД исследуемых поринов в далекой УФ-области (190–240 нм), области поглощения пептидных связей, существенно различаются. OmpF-белок имеет в этой области отри-

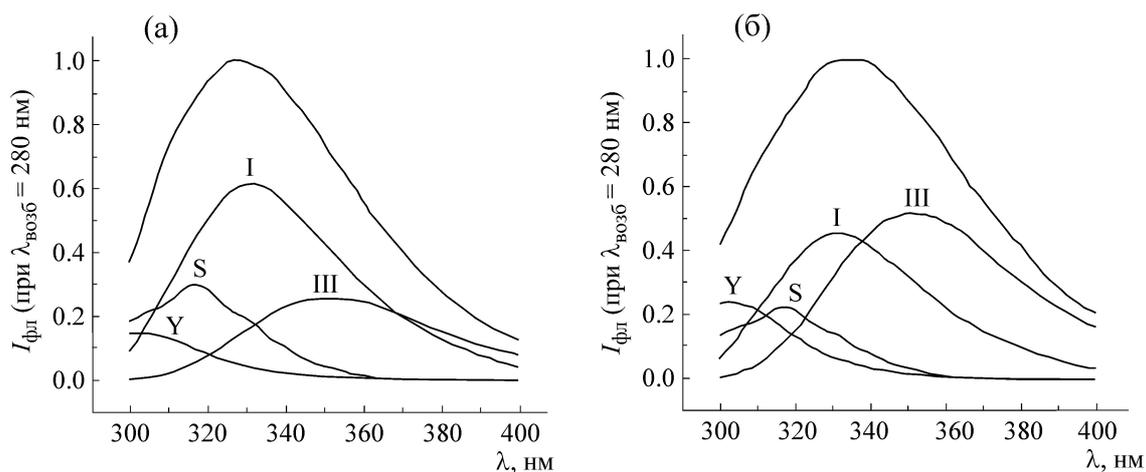
цательную полосу небольшой эллиптичности с «плечами» при 215 и 202 нм и положительную полосу малой эллиптичности при 195 нм (рис. 1а, кривая 2). Форма спектра КД этого пориона указывает на достаточно высокое содержание  $\beta$ -структуры и присутствие небольшого количества  $\alpha$ -спиральных участков в полипептидной цепи белка. Спектр КД OmpC-пориона в этой области имеет отрицательную полосу при 220 нм и положительную полосу большой эллиптичности при 197 нм, что свидетельствует о высоком содержании  $\alpha$ -спирали во вторичной структуре белка. (рис. 1б, кривая 2).

Выводы, сделанные на основе качественной оценки КД-спектров исследуемых поринов, были подтверждены расчетом элементов вторичной структуры, выполненным с помощью пакета программ CDPPro [10]. Как следует из данных табл. 1, содержание  $\alpha$ -спирали в OmpC-порионе в 2,4 раза больше, нежели в OmpF-белке. Поскольку оба порообразующих белка, выделенных из наружной мембраны *Y. ruckeri*, имеют высокое содержание (62,8 и 60,6%) суммарной  $\beta$ -структуры, их можно отнести к белкам  $\beta$ -класса, что характерно для изолированных поринов грамотрицательных бактерий в растворах детергентов.

**Таблица 1.** Содержание элементов вторичной структуры OmpF- и OmpC-поринов *Y. ruckeri*

Образец белка	$\alpha$ -Спираль, %			$\beta$ -Структура, %			$\beta$ -Изгиб, %	Неупорядоченная структура, %
	I	II	III	I	II	III		
OmpF	2,3	3,9	6,2	28,9	12,3	41,2	21,6	31,1
OmpC	6,1	8,9	15,0	25,4	12,7	38,1	22,5	24,5

Примечание. I, II, III – регулярная, искаженная и общая структуры соответственно.



**Рис. 2.** Спектры флуоресценции поринов *Y. ruckeri* и их аппроксимация спектральными формами излучения остатков тирозина (Y) и триптофана (формы S, I, III). Возбуждение на длине волны 280 нм. Температура 20°C. (а) – Спектр OmpF-порина: вклады остатков тирозина (27,9%) и спектральных форм триптофана S, I и III (14,0, 47,7 и 24,5% соответственно). (б) – Спектр OmpC-порина: вклады остатков тирозина (11,4%) и спектральных форм триптофана S, I и III (10,9, 32,4 и 45,3% соответственно).

**Собственная белковая флуоресценция.** Спектры суммарной флуоресценции OmpF- и OmpC-поринов *Y. ruckeri* имеют различное положение максимумов. В случае OmpF-порина максимум суммарной эмиссии находится при  $323 \pm 1$  нм, а в случае OmpC-белка – при  $339 \pm 1$  нм. Максимумы триптофановой флуоресценции обоих поринов находятся, соответственно, при  $335 \pm 1$  и  $340 \pm 1$  нм. Аппроксимация суммарной эмиссии исследуемых белков спектральными формами излучения остатков триптофана и тирозина (рис. 2) показала, что в случае OmpF-порина 24% остатков триптофана приходится на долю формы III (максимально доступной растворителю), а в случае OmpC-белка это значение достигает 45%.

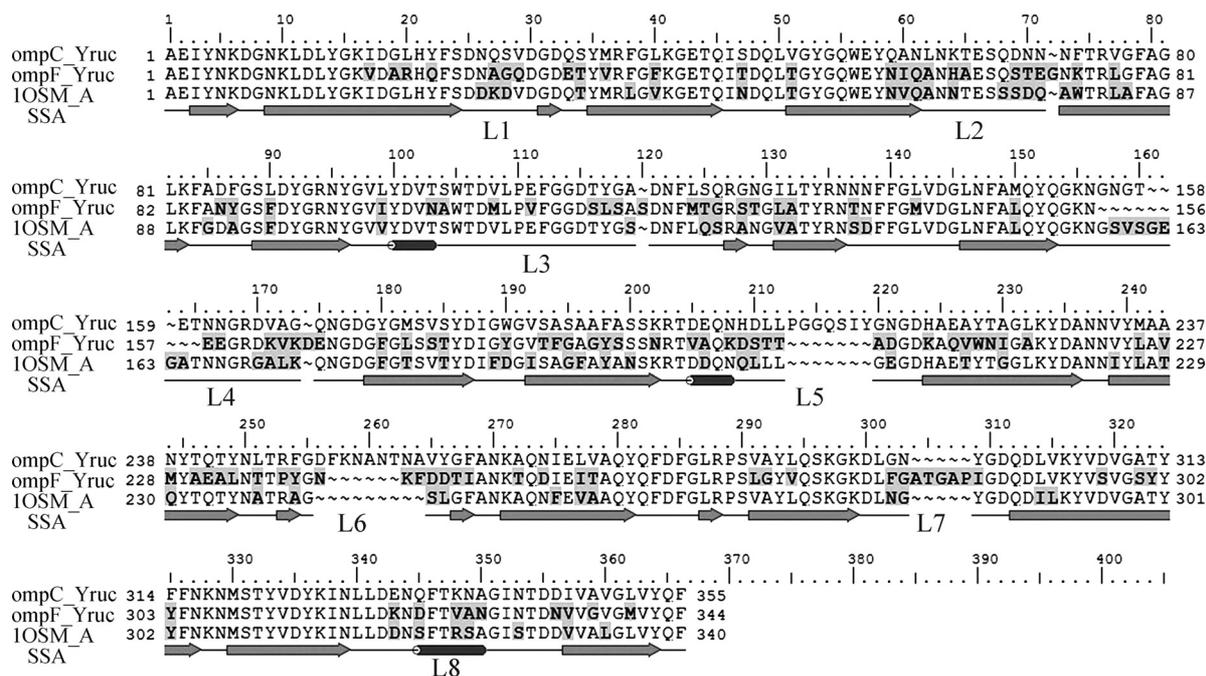
Следует отметить, что для обоих белков характерна невысокая интенсивность флуоресценции остатков триптофана. Это также свидетельствует о том, что значительная часть остатков этого ароматического флуорофора в составе обоих белков либо подвергается тушению со стороны соседних групп, либо доступна растворителю.

Таким образом, изолированные OmpF- и OmpC-порины наружной мембраны *Y. ruckeri* в растворах детергентов имеют нативоподобную структуру и представляют собой  $\beta$ -структурные мембранные белки, которые по своей пространственной структуре подобны неспецифическим поринам иерсиний [5] и других энтеробактерий [18]. Методами кругового дихроизма и собственной белковой флуоресценции показано, что пространственные структуры OmpF- и OmpC-поринов *Y. ruckeri* отличаются

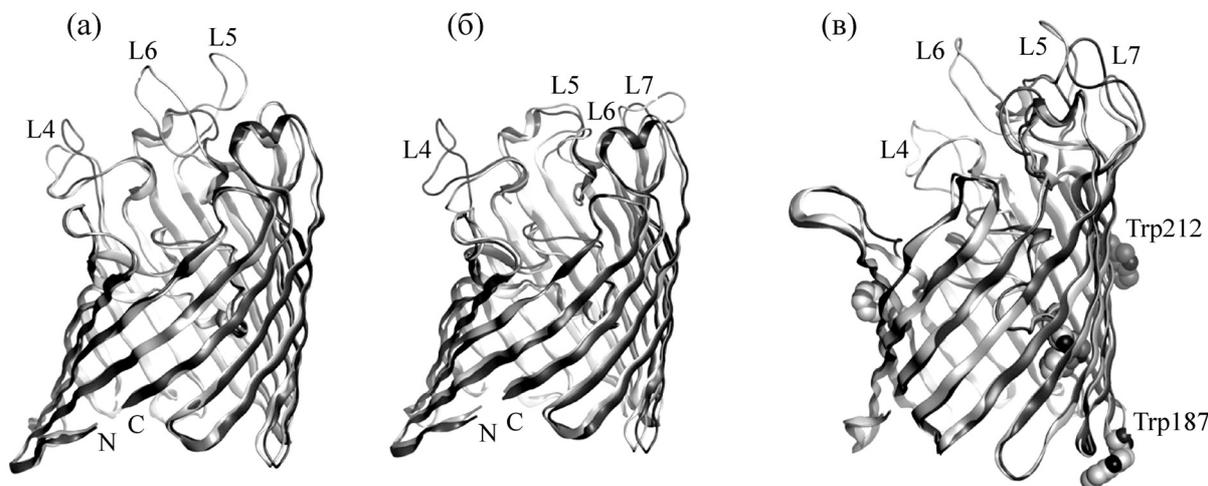
соотношением элементов вторичной структуры и различным локальным окружением остатков триптофана.

**Моделирование 3D-структуры мономеров и тримеров OmpF- и OmpC-поринов *Y. ruckeri*.** Анализ аминокислотных последовательностей поринов *Y. ruckeri* OmpF (код Uniprot E2FHC9) [13] и OmpC (код Uniprot C4UFZ3) проведен с помощью модуля поиска прототипов программы MOE 2014.09 [14]. Кристаллическая структура осмопорина (Ompk36) *K. pneumoniae* (код PDB 1OSM) [15] была использована в качестве прототипа для построения моделей поринов *Y. ruckeri*. Идентичность аминокислотных последовательностей OmpF- и OmpC-поринов *Y. ruckeri* и прототипа составляют 63,5 и 75,4%, а подобие – 72,0 и 83,0% соответственно. Выравнивание аминокислотных последовательностей OmpF- и OmpC-поринов *Y. ruckeri* и прототипа, на основе которого получены 3D-модели мономеров поринов, показано на рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей поринов *Y. ruckeri* и осмопорина *K. pneumoniae* показало, что OmpF- и OmpC-порины имеют различный размер внешних петель L4–L7.

Теоретические модели пространственных структур OmpF- и OmpC-поринов *Y. ruckeri* (рис. 4в) построены методом сравнительного моделирования с помощью программы MOE 2014.09 [14]. После 3D-протонирования окончательной модели проводили оптимизацию структуры молекул методом минимизации энергии с потенциалом сил Amber12:ЕНТ [19]. Величина потенциальной энергии 3D-моделей



**Рис. 3.** Выравнивание аминокислотных последовательностей OmpF- и OmpC-порinov *Y. ruckeri* и прототипа осмопорина *K. pneumoniae* (код PDB IOSM). Наружные петли L1-L8 и элементы вторичной структуры указаны в соответствии с кристаллической структурой осмопорина:  $\alpha$ -структура показана в виде цилиндра,  $\beta$ -структура – в виде стрелки. Рисунок выполнен с помощью программы Maestro 10.1 (Schrödinger, LLC).



**Рис. 4.** 3D-суперпозиция моделей мономеров поринов *Y. ruckeri* OmpC (а) и OmpF (б) и осмопорина *K. pneumoniae* (код PDB IOSM\_A). Структуры белков показаны в виде ленточных диаграмм. Структуры OmpC- и OmpF-поринов *Y. ruckeri* показаны светло-серым цветом, осмопорина *K. pneumoniae* – темно-серым цветом. На рисунке отмечены положения N- и C-концов и внешних петель. (в) – 3D-суперпозиция моделей мономеров OmpC- и OmpF-поринов *Y. ruckeri*. Структуры белков показаны в виде ленточных диаграмм светло-серого (OmpC) и темно-серого (OmpF) цвета. Остатки триптофанов показаны в объемном виде: Trp212 OmpF-порина – темно-серым цветом, Trp184 OmpC-порина – светло-серым цветом. На рисунке отмечены петли L4-L7, для которых наблюдаются наибольшие различия в структуре.

OmpF- и OmpC-поринов *Y. ruckeri* составляет  $-17794,8$  кДж/моль и  $-19882,6$  кДж/моль соответственно и свидетельствует о стабильности структуры белков. Анализ контактов в структуре мономеров показал, что структуры пори-

нов стабилизированы водородными и ионными связями и гидрофобными контактами (табл. 2).

На рис. 4 показана суперпозиция пространственной структуры мономеров исследуемых поринов и прототипа. Качество построенных

**Таблица 2.** Количество контактов, стабилизирующих структуру мономеров OmpC- и OmpF-поринов *Y. ruckeri*

Вид контактов	Количество контактов в мономере OmpF	Количество контактов в мономере OmpC
Водородные связи	105	105
Гидрофобные контакты	47	50
Ионные связи	22	15

**Таблица 3.** Содержание элементов вторичной структуры 3D-моделей мономеров OmpC- и OmpF-поринов *Y. ruckeri* и прототипа

Порин	$\alpha$ -Спираль, %	$\beta$ -Структура, %	Неупорядоченная структура, %
OmpF <i>Y. ruckeri</i>	5,8	56,4	37,8
OmpC <i>Y. ruckeri</i>	5,1	58,9	36,0
1OSM <i>K. pneumoniae</i>	6,4	56,1	37,4

моделей проверено программой МОЕ. Суперпозиция всех  $\alpha$ -атомов 3D-моделей поринов *Y. ruckeri* и прототипа показала, что величина среднеквадратичного отклонения для OmpC- и OmpF-поринов составляет 0,68 и 0,77 Å соответственно.

Структуры мономеров *Y. ruckeri* по аналогии с прототипом представляют собой  $\beta$ -баррель (бочонок), образованный 16-ю  $\beta$ -тяжами, связанными восемью короткими периплазматическими петлями и восемью наружными петлями различной длины L1–L8 (рис. 4а,б). Петля L2 участвует в образовании олигомерной структуры поринов. Петля L3 поринов направлена к центру поры, где она образует сужение канала. Петли L1 и L4–L8 направлены во внеклеточное пространство. Эти участки аминокислотной последовательности поринов как правило служат антигенными детерминантами этих белков [20], а также сайтами связывания бактериофагов, бактериоцинов и комплемента.

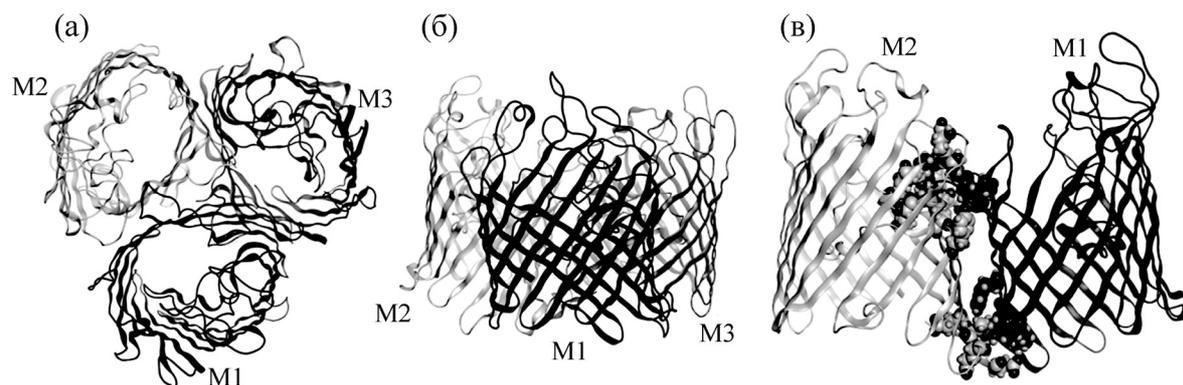
Основные элементы пространственной структуры белков имеют значительное сходство в строении, однако петли L4, L5 и L6 OmpC-порина более длинные, а петля L7 более короткая, чем соответствующие петли OmpF-порина. Кроме того, у OmpC- и OmpF-поринов *Y. ruckeri* обнаружены различия в локализации одного из остатков Trp (рис. 4в). Так, Trp212 в десятом  $\beta$ -тяже в OmpF-белке входит в состав так называемого гидрофобного пояса (гирлянды), расположенного на внешней стороне барреля, что предполагает его взаимодействие с другими находящимися вблизи ароматическими остатками. В OmpC-порине остаток Trp184 расположен в цитоплазматической петле, «выходит» на поверхность молекулы порина и не

имеет такого гидрофобного окружения, как Trp212 в OmpF-белке.

Пространственные структуры неспецифических OmpC- и OmpF-поринов *Y. ruckeri* использовали для расчета содержания элементов вторичной структуры с помощью программы МОЕ (табл. 3). Сравнение содержания элементов вторичной структуры OmpC- и OmpF-поринов *Y. ruckeri* и прототипа показало, что содержание  $\beta$ -структуры, основного элемента пространственной организации этих белков, хорошо согласуется с экспериментальными данными, полученными методами спектроскопии КД (табл. 1)

Функционально активной формой поринов в мембране является тример. Теоретические модели тримеров OmpC- и OmpF-поринов *Y. ruckeri* были построены и оптимизированы с помощью программы МОЕ 2014.09 [14] с использованием в качестве прототипа кристаллической структуры тримера осмопорина (OmpK36) *K. pneumoniae* (рис. 5). Анализ контактов в тримерах исследуемых белков показал, что олигомерная структура поринов стабилизируется водородными и ионными связями, а также гидрофобными межмономерными контактами (табл. 4). Полярные контакты образуются в области внешних петель с участием петли L2 и со стороны периплазмы (рис. 5а). В стабилизации олигомерной структуры OmpF-порина *Y. ruckeri* участвует большее количество контактов, чем количество контактов, стабилизирующих структуру OmpC-тримера *Y. ruckeri* (табл. 4). Это коррелирует с данными о термостабильности исследуемых белков.

Таким образом, впервые построены полноатомные модели высокой точности простран-



**Рис. 5.** Пространственная структура тримера OmpF-порина *Y. ruckeri*: вид сверху (а) и сбоку (б). Мономеры показаны светло-серым, серым и темно-серым цветом в виде ленточных диаграмм. (в) – Полярные межмономерные контакты мономеров M1 и M2, стабилизирующие структуру тримера. Структура мономеров M1 и M2 порина показана в виде ленточной диаграммы светло-серого и темно-серого цвета. Аминокислотные остатки, образующие полярные контакты, показаны в объемном виде.

ственной структуры мономеров и тримеров OmpC- и OmpF-поринов *Y. ruckeri*. Сравнение пространственных структур OmpC- и OmpF-поринов *Y. ruckeri* показало, что основные различия наблюдаются в строении внешних петель. В молекулах OmpC- и OmpF-поринов присутствуют три остатка триптофана, локализация двух из которых консервативна, а положение третьего остатка триптофана в белках разных типов отличается.

**Сравнительный анализ изменений в молекулярной структуре и микроокружении ароматических флуорофоров в молекулах OmpF- и OmpC-поринов в процессе термоденатурации.** Для того чтобы определить, насколько различия в пространственной структуре исследуемых белков влияют на их термоустойчивость, мы провели сравнительный анализ изменений в их молекулярной структуре под действием температуры с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (рис. 6). Полученные данные свидетельствовали о различной стабильности тримерной структуры исследуемых поринов. Заметная полоса в области мономера OmpF-белка появилась при температуре 70–80°C, полное превращение олигомеров в денатурированный мономер наблюдалось только при температуре 90°C.

В случае OmpC-порина диссоциация тримеров белка началась при 65°C и заканчивалась при 75°C.

Изучение процесса температурной денатурации исследуемых белков с помощью метода собственной белковой флуоресценции подтвердило результаты, полученные с помощью электрофореза. Обнаружено, что в процессе термоденатурации белков в микроокружении ароматических флуорофоров в составе OmpF- и OmpC-поринов происходят различные изменения, поскольку характер изменения интенсивности суммарной эмиссии исследуемых поринов под действием температуры различается (данные не приведены). Середины переходов, отражающих зависимость изменения соотношения  $R (I_{320}/I_{350})$  от температуры при термоденатурации OmpF и OmpC приходятся на 87 и 70°C соответственно. Таким образом, подобно неспецифическим поринам из наружных мембран других грамотрицательных бактерий, OmpF-порин *Y. ruckeri* оказался более устойчив к действию температуры, нежели порин OmpC-типа.

Существенные различия были обнаружены также в характере изменения положения максимума триптофановой флуоресценции исследуемых белков. Как видно из рис. 6в, в случае

**Таблица 4.** Межмономерные контакты, стабилизирующие структуры тримеров OmpC- и OmpF-поринов *Y. ruckeri*

Вид контактов	Количество контактов в тримере OmpF	Количество контактов в тримере OmpC
Водородные связи	24	19
Гидрофобные контакты	38	35
Ионные связи	6	6

**Таблица 5.** Влияние температуры на доступность растворителю остатков Trp184 OmpC- и Trp212 OmpF-поринов *Y. ruckeri*.

Аминокислотные остатки	Trp184 OmpC <i>Y. ruckeri</i>		Trp212 OmpF <i>Y. ruckeri</i>	
Температура, °C	27	97	27	97
Доступность растворителю, %	97	98	57	100

Примечание. Расчет поверхности, доступной растворителю, проведен с помощью программы DiscoveryStudio 3.0 (Accelrys Software Inc., Discovery Studio Modeling Environment, Release 3.0, San Diego:Accelrys Software Inc., 2010) с размером сетки 240 точек на атом и радиусом пробы 1,0 Å.

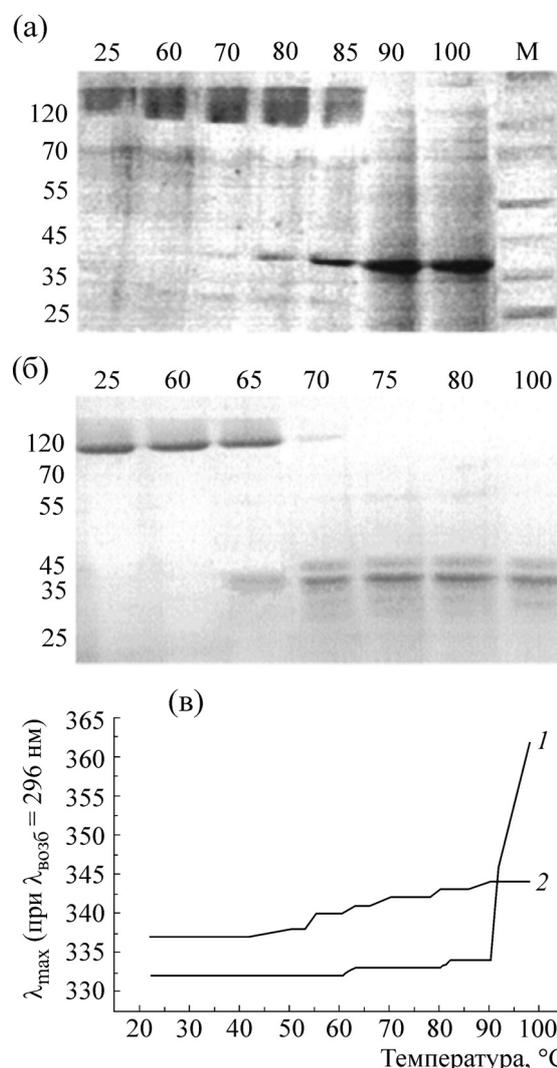
OmpC-порина существенный сдвиг  $\lambda_{max}$  в длинноволновую область спектра при нагревании белка не наблюдается. Это свидетельствует о том, что изменение конформации молекулы OmpC-порина в процессе термоденатурации скорее всего мало связано с изменением доступности остатков Trp растворителю. Напротив, для OmpF-порина при температуре выше 90°C характерно резкое изменение микроокружения остатков Trp, связанное с высококооперативным переходом этих флуорофоров в состояние, подобное состоянию свободного Trp.

Для анализа изменений в конформации (пространственной ориентации) остатков триптофана в OmpC- и OmpF-поринах из *Y. ruckeri*, наблюдаемой в результате термоденатурации этих белков, был использован метод молекулярной симуляции 3D-структур мономеров этих белков при температурах 300 и 370 К (27 и 97°C). Расчет происходящих в процессе термоденатурации изменений в доступности растворителю тех остатков триптофана, которые имеют различную локализацию в полипептидной цепи исследуемых белков, показал следующий эффект. При увеличении температуры от 27 до 97°C остаток Trp212 OmpF-порина становится в два раза более доступным для растворителя, в то время как Trp184 OmpC-порина не меняет своей доступности (табл. 5).

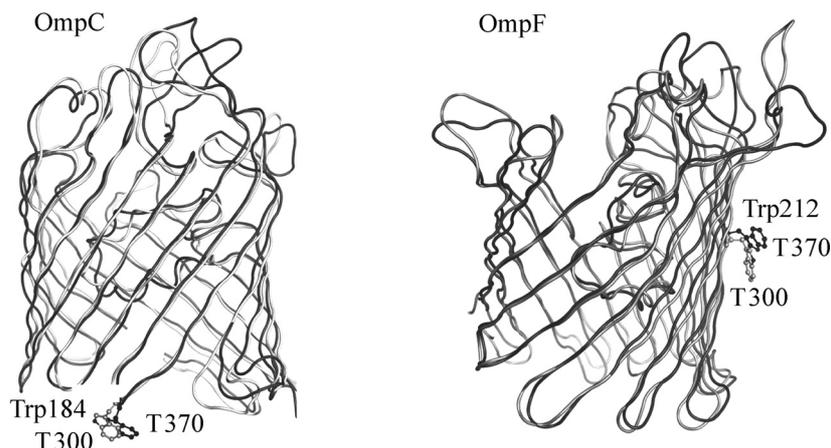
С помощью моделей пространственной структуры исследуемых белков и молекулярно-динамической симуляции поринов при повышенной температуре было показано, как изменяется положение боковой цепи остатков триптофана относительно поверхности барреля OmpF- и OmpC-поринов при термоденатурации (рис. 7).

Как видно из данных рис. 7, для OmpF-порина при термоденатурации характерно значительное изменение положения индольного кольца остатка Trp212. В нативном OmpF-белке плоскость этого кольца расположена практически параллельно тяжам барреля, при повышенной температуре она разворачивается (почти на 90° по отношению к исходному положению). В случае OmpC-порина изменения, про-

исходящие в процессе термоденатурации, мало связаны с изменением доступности остатков Trp184 растворителю.



**Рис. 6.** Электрофореграммы образцов поринов *Y. ruckeri* OmpF (а) и OmpC (б), прогретых в течение 10 мин при различных температурах. М – белки-маркеры (молекулярная масса указана в кДа). (в) – Изменение положения максимума спектра триптофановой флуоресценции поринов *Y. ruckeri* в процессе термоденатурации: кривая 1 – OmpF, кривая 2 – OmpC.



**Рис. 7.** Суперпозиция 3D-структур мономеров OmpF- и OmpC-поринов *Y. ruckeri* после молекулярно-динамической симуляции в течение 1 нс при температуре 300 и 370 К. Структура белка показана светло-серым (300 К) и темно-серым цветом (370 К). Аминокислотные остатки Trp212 и Trp184 показаны в шаростержневой форме светло-серым цветом (300 К) и темно-серым цветом (370 К).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе проведено сравнение пространственных структур OmpF- и OmpC-поринов *Y. ruckeri* методами кругового дихроизма и собственной белковой флуоресценции. Показано, что пространственные структуры исследуемых поринов отличаются соотношением элементов вторичной структуры и различным локальным окружением остатков триптофана. Методами структурной биоинформатики получены полноатомные модели высокой точности OmpF- и OmpC-поринов *Y. ruckeri*. Содержание  $\beta$ -структуры, рассчитанное для теоретических моделей, хорошо коррелирует с экспериментальными данными, полученными методами оптической спектроскопии. Показано, что структура тримера OmpF стабилизируется большим числом межмономерных контактов в сравнении с тримером OmpC *Y. ruckeri*, что объясняет различную термостабильность исследуемых поринов. Методом молекулярной динамики впервые показано, что определяющим фактором в характере изменения параметров спектра триптофановой флуоресценции OmpF-порины *Y. ruckeri* при повышении температуре (в частности, сдвига максимума эмиссии триптофана в длинноволновую область) является изменение конформации (пространственной ориентации) остатков Trp212. Доступность этого остатка триптофана растворителю увеличивается почти в два раза. Конформационный переход в молекуле OmpC-порины в процессе термоденатурации, напротив, мало связан с изменением доступности остатков Trp184 растворителю.

Как показали наши исследования, для определения тонкой структурной организации мо-

лекулы белка чрезвычайно полезным может оказаться установление корреляции между расположением ароматических флуорофоров и характером изменения параметров излучения белка, например, под воздействием тех или иных денатурирующих факторов. Такой подход может быть реализован при систематическом изучении белков, имеющих подобную пространственную организацию в целом, и одновременно характерные структурные особенности, возможно, определяющие их свойства. В случае установления такой корреляции, используя минимальное количество вещества, необходимое для спектроскопического анализа, можно получить достоверную информацию об особенностях структуры конкретного исследуемого белка (в общем ряду ему подобных).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. Nikaido, *Microbiol. & Mol. Biol. Rev.* **67**, 593 (2003).
2. A. Alcaraz, E. M. Nestorovich, M. Aguilera-Arzo, et al., *Biophys. J.* **87** (2), 943 (2004).
3. X. Q. Liu and T. Ferenci, *J. Bacteriol.* **196** (10), 3917 (2014).
4. И. В. Смирнов, *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* **6** (1), 10 (2004).
5. О. П. Вострикова, Н. Ю. Ким, Г. Н. Лихацкая и др., *Биоорганич. химия* **32** (4), 371 (2006).
6. О. Д. Новикова, Т. И. Вакорина, В. А. Хоменко и др., *Биохимия* **73** (2), 173 (2008).
7. О. Д. Новикова, В. А. Хоменко, В. И. Емельяненко и др., *Биол. мембраны* **28** (1), 1 (2011).
8. V. Consalvi, R. Chiaraluce, L. Giangiacomo, et al., *Protein Eng.* **13** (7), 501 (2000).

9. Д. К. Чистюлин, О. Д. Новикова, В. А. Хоменко и др., Биол. мембраны **29** (3), 156 (2012).
10. N. Sreerama and R. W. Woody, Anal. Biochem. **287** (2), 252 (2000).
11. E. A. Burstein, N. S. Vedenkina, and M. N. Ivkova, Photochem Photobiol. **8**, 263 (1973).
12. D. W. Marquardt, J. Soc. Indust. Appl. Math. **11**, 431 (1963).
13. A. M. Stenkova, M. P. Isaeva, F. N. Shubin, et al., PLoS ONE **6** (5), e20546.10.1371/journal.pone.0020546 (2011).
14. Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2013; <http://www.chemcomp.com>
15. R. Dutzler and T. Schirmer, J. Structure **7**, 425 (1999).
16. B. Hess, C. Kutzner, D. Spoel, and E. Lindahl, J. Chem. Theory and Computation **4** (3), 435 (2008).
17. О. Д. Новикова, Л. И. Федорева, В. А. Хоменко и др., Биооргани. химия **19** (5), 536 (1993).
18. J. P. Rosenbusch, J. Biol. Chem. **249** (24), 8019 (1974).
19. D. Case et al., AMBER 12, University of California, San Francisco (2012).
20. A. Arockiasamy, G. S. Murthy, M. R. Rukmini, et al., J. Struct. Biol. **148**, 22 (2004).

## Comparative Analysis of the Spatial Structure of Nonspecific Porins from *Yersinia ruckeri*

### Using Optical Spectroscopy and Molecular Modeling Methods

G.N. Likhatskaya, D.K. Chistyulin, N.Y. Kim, V.A. Khomenko, O.Y. Portnyagina,  
T.F. Solovyeva, and O.D. Novikova

*Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,  
prosp. 100 let Vladivostoku 159, Vladivostok 690022, Russia*

Using optical spectroscopy and molecular modeling methods the spatial organization of outer membrane porins was studied. OmpF and OmpC porins from *Y. ruckeri* were found to be the  $\beta$ -structured membrane proteins typical of pore-forming proteins of other Gram-negative bacteria. With the methods for structural bioinformatics models of the spatial structure of monomers and trimers of OmpC and OmpF porins from *Y. ruckeri* were created. It was found that structural stability of more thermostable OmpF trimer is sustained by the greater number of hydrogen bonds and hydrophobic interactions. It was shown that the main differences in spatial structures of the studied porins are observed in the structure of their outer loops. The three tryptophan residues are present in the molecules of OmpC and OmpF porins from *Y. ruckeri*. Using molecular dynamics simulation it was shown that after thermal denaturation the solvent accessibility of Trp212 residue in OmpF porin increased twofold, but the solvent accessibility of Trp184 residue in OmpC porin remained unchanged. It is assumed that the red-shifted tryptophan fluorescence spectrum of OmpF porin during thermal denaturation is due to the behavior of Trp212 residue.

*Key words: Yersinia ruckeri, pore-forming proteins, spatial structure, optical spectroscopy, molecular modeling*