

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 576.858:616.921.5+546.11.02.3

НЕУПОРЯДОЧЕННЫЕ ОБЛАСТИ В СТРУКТУРЕ С-ДОМЕНА БЕЛКА M1 ВИРУСА ГРИППА

© 2011 г. А. Л. Ксенофонтов^{1*}, Е. Н. Добров¹, Н. В. Федорова¹, В. А. Радюхин¹, Г. А. Бадун²,
А. М. Арутюнян¹, Е. Н. Богачева³, Л. А. Баратова¹

¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

²Химический факультет Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

³Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, 119991

Поступила в редакцию 23.09.2010 г.

Принята к печати 30.11.2010 г.

Матриксный белок M1 вируса гриппа — один из основных структурных компонентов вириона, выполняющий в ходе вирусной инфекции ряд различных функций. Данные рентгеноструктурного анализа (с разрешением 2.08 Å) существуют лишь для N-концевой части этого белка (остатки 2–158), не содержащей C-концевой домен (159–252). Структуру белка M1 вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в кислой среде исследовали методом тритиевой планиграфии. Проанализировано включение тритиевой метки в домены белка M1 и установлена преимущественная доступность тритию C-домена и петлевых междоменных областей. С помощью аналитического центрифугирования и динамического лазерного светорассеяния обнаружены аномальные гидродинамические размеры и низкая структурированность белка M1, подтвержденная также данными кругового дихроизма. Биоинформатический анализ последовательности белка M1 выявил наличие неструктурированных областей, сконцентрированных в C-домене и в петлевых областях между N, M и C-доменами. Высказано предположение о том, что полифункциональность белка в клетке обусловлена пластичностью его третичной структуры, возникающей за счет неструктурированных участков.

Ключевые слова: белок M1 вируса гриппа, пространственная структура, тритиевая планиграфия, биоинформатический анализ, круговой дихроизм.

DISORDERED REGIONS IN C-DOMAIN STRUCTURE OF INFLUENZA VIRUS M1 PROTEIN, by A. L. Ksenofontov^{1*}, E. N. Dobrov¹, N. V. Fedorova¹, V. A. Radyukhin¹, G. A. Badun², A. M. Arutyunyan¹, E. N. Bogacheva³, L. A. Baratova¹ (¹Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119199 Russia, *e-mail: ksenofon@belozersky.msu.ru; ²Chemistry Department, Moscow State University, Moscow, 119199 Russia, ³Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia). Influenza virus matrix M1 protein is one of the main structural components of the virion performing also many different functions in infected cell. X-ray analysis data with 2.08 Å resolution were obtained only for the N-terminal part of M1 protein molecule (residues 2–158) but not for its C-terminal domain (159–252). In the present work M1 protein of A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) virus strain in acidic solution was investigated with the help of tritium bombardment. Tritium label incorporation into M1 protein domains preferentially labeled the C-domain and inter-domain loops. Analytical centrifugation and dynamic light scattering experiments demonstrated increased hydrodynamic parameters (diameter) that may be explained by low degree of M1 structural organization. Computational analysis of M1 protein by intrinsic disorder predictions methods also demonstrated the presence of unfolded regions mostly in the C-domain and inter-domain loops. It is suggested, that influenza virus M1 polyfunctionality in infected cell is determined by its tertiary structure plasticity which in its turn results from the presence of unstructured regions.

Keywords: matrix protein M1 of influenza virus, 3D structure, tritium bombardment, intrinsic disorder predictions, circular dichroism.

Принятые сокращения: ВГ — вирус гриппа; РНП — рибонуклеопротеид; БСА — бычий сывороточный альбумин; НС — неструктурированные сегменты; ТП — тритиевая планиграфия; КД — круговой дихроизм; РСА — рентгеноструктурный анализ; АЦ — аналитическое центрифугирование; ДЛС — динамическое лазерное светорассеяние; ГА — гемагглютинин; НА — нейраминидаза. МЭС — 2-/N-морфолино/-этансульфоновая кислота.

* Эл. почта: ksenofon@belozersky.msu.ru

Принадлежащий к оболочечным вирусам вирион вируса гриппа (ВГ) – яркий пример высокоорганизованного надмолекулярного липид-белкового ансамбля. Существование такой совершенной пространственной структуры достигнуто посредством высокоспецифичных взаимодействий его основных структурных компонентов. Оболочка вириона представляет собой бислойную липидную мембрану, которая поддерживается изнутри примыкающим к ней слоем основного структурного компонента вириона – матриксного белка М1, организованного в упорядоченную спиралеобразную структуру [1, 2]. Два других структурообразующих компонента вириона – это поверхностные гликопротеиды гемагглютинин (ГА) и нейраминидаза (НА), которые заякорены на поверхности мембраны своими трансмембранными фрагментами и взаимодействуют с белком М1 [3]. Этот белок определяет общую морфологию вирионов и их репликацию в клетке, обеспечивая экспорт вирусного рибонуклеопротеидного (РНП) комплекса из ядра в цитоплазму посредством взаимодействия как с ним, так и с белком ядерного экспорта [4, 5]. Белок М1 выполняет определяющую роль при сборке и почковании вируса за счет своей выраженной склонности к самополимеризации и ассоциации с липидной мембраной клетки, равно как и с трансмембранными фрагментами ГА и НА [3].

Белок М1 состоит из трех доменов: двух компактных α -спиральных доменов NM (2–158) и C-домена с неизвестной структурой (160–252). Только для N-концевых 2/3 последовательности белка М1 (остатки 2–158) с помощью рентгеноструктурного анализа (РСА) определена пространственная структура [6]. В процессе кристаллизации полноразмерного белка М1, выделенного из частиц ВГ [6], и рекомбинантного М1, продуцированного в *Escherichia coli* [7], C-домен отщеплялся.

Как белок М1 может выполнять много различных функций в клетке? Существование целого класса так называемых нативно-развернутых, неструктурированных белков (intrinsically disordered proteins-IDPs) позволяет по-новому взглянуть на структурно-функциональные особенности белка М1. В последние годы обнаружено, что неструктурированные сегменты (НС) белковой цепи (участки, не имеющие при физиологических условиях фиксированной пространственной структуры) часто выполняют жизненно важные функции. Обычно они вовлечены в сигнальные и регуляторные пути через специфические белок-белковые, нуклеино-белковые и белок-лигандные взаимодействия [8, 9]. На сегодняшний день известно более 550 белков с НС [10]. Считают, что отсутствие термодинамически устойчивой конформации позволяет белку быть многофункциональным и легко подстраиваться под разных “партнеров”. Уникальная структура белков есть результат баланса между конформационной энтропией и энергией взаимодействий боко-

вых радикалов аминокислот [11]. Неупорядоченность конформации белка должна быть заложена в его первичной структуре. Разработан ряд специализированных программ предсказания неупорядоченных областей, принцип работы которых основан или на физико-химических свойствах составляющих их аминокислот, или на сравнении с гомологичными последовательностями [12]. Мы предположили, что наличие НС в структуре белка М1 необходимо для его взаимодействия с различными по структуре и свойствам “партнерами” в клетке и вирусе.

Ранее нами проведены эксперименты по изучению структуры белка М1 в составе вируса [13] и в кислом растворе [14] методом тритиевой планиграфии (ТП) [15].

В данной работе изучены гидродинамические свойства и структурированность белка М1 в растворе с помощью методов аналитического центрифугирования (АЦ), динамического лазерного светорассеяния (ДЛС) и КД-спектроскопии. Кроме того, исследовано присутствие НС с использованием ряда предсказательных компьютерных программ в структурах белка М1 ВГ типов А и В. Также проанализировано включение тритиевой метки в домены белка М1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение препарата белка М1. Выделение белка М1 из очищенной вирусной суспензии по методу Жирнова [16] проводили кислотной солиubilизацией мембраны ВГ мягким неионным детергентом NP40 (Igepal) в МЭС-буфере (50 мМ 2-/N-морфолино-/этансульфоновая кислота, 100 мМ NaCl, pH 4.0). Полученные препараты с концентрацией 0.1–0.3 мг/мл хранили при +4°C не дольше двух недель.

Бомбардировку атомарным тритием белка М1 в растворе проводили на установке, описанной ранее [13, 15]. Коротко, тритиевую метку вводили бомбардировкой раствора потоком атомарного трития, нагретом до 2000 К. Тонкую пленку белка (0.8 мл с концентрацией 0.3–0.5 мг/мл в 0.4 М NaCl, 0.2 М МЭС, pH 4.0) получали на внутренней поверхности стеклянного реактора, после чего замораживали и термостатировали при температуре жидкого азота (77 К). Условия мечения: три экспозиции по 10 с (с интервалами 30 с) с заполнением сосуда тритиевым газом до давления 0.5 Па. Последующую очистку препарата от обмениваемого трития, фрагментацию белка М1 на пептиды, гидролиз и анализ радиоактивности в аминокислотах выполняли, как описано в работе [13]. Далее рассчитывали среднюю радиоактивность остатка в доменах и междоменных связках (1–66, 67–90, 91–157, 158–178 и 179–252) и нормировали ее на среднюю радиоактивность остатка во всем белке М1.

Таблица 1. Сравнение доли неупорядоченных участков в С(160–252)- и N(1–159)-фрагментах М1 белка вируса гриппа (ВГ) штамма А/Пуэрто-Рико/8/34 (Н1N1), рассчитанных с помощью различных программ

№	Метод предсказания	На чем основан алгоритм предсказания	Неструктурированные остатки во фрагменте белка*, %		
			1–159	160–252	1–252
1	IUPred (http://iupred.enzim.hu)	Оценка способности остатка образовывать выгодные парные контакты.	4 (7)	66 (61)	27 (68)
2	DISOPRED (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/disopred)	Нейронная сеть, выявляющая участки, пропущенные в структурах PDB-банка.	3 (4)	42 (39)	17 (43)
3	DisEMBL (http://dis.embl.de)	Поиск НС в структурах белков PDB-банка.	3 (4)	39 (36)	16 (40)
4	FoldUnfold (http://skuld.protres.ru/~mlobanov/ogu/ogu.cgi)	Ожидаемое среднее число сближенных остатков.	7 (11)	35 (33)	17 (44)
5	PrDoc (http://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi)	Определяет весовое отношение неупорядоченности остатка, оцененной аналогично методу 2, среди гомологичных белков	11 (17)	31 (29)	18 (46)
6	FoldIndex (http://bip.weizmann.ac.il/fldbin/findex) Среднее	Средняя гидрофобность и заряд участка белка	16(26)	29 (27)	21 (53)
			7 ± 4 (12 ± 6)	40 ± 9 (39 ± 11)	20 ± 4 (51 ± 11)

* В скобках указано число неструктурированных остатков в данном фрагменте.

Предсказание неупорядоченных областей. Чтобы проанализировать структурированность белка М1, использовали ряд предсказательных программ, размещенных на доступных веб-сервисах. Эти программы основаны на различных алгоритмах и предпосылках: IUPred [17], DISOPRED [18], DisEMBL [19], FoldUnfold [11], PrDoc [20], FoldIndex [21] (см. табл. 1).

КД в дальнем ультрафиолете. Спектры КД препаратов белка М1 в области 195–250 нм в МЭС-буфере измеряли на дихрографе Chirascan CD spectrometer (Applied Photophysics, Leatherhead, Англия) в кюветах с длиной оптического пути, равной 0.1–0.01 см. Величины КД выражали в величинах молярной эллиптичности $[\Theta]$ ($[\Theta] = 3300 \times \Delta\epsilon$). Молярный коэффициент дихроического поглощения для препаратов белка $\Delta\epsilon$ рассчитывали на моль аминокислотных остатков. Расчет проводили по формуле $\Delta\epsilon = \Delta D / (c \times l)$, где ΔD – измеренная величина дихроизма, c – концентрация белка (в молях аминокислотных остатков), l – длина оптического пути (см). Среднюю молекулярную массу аминокислотного остатка принимали равной 110 г/моль. Расчет процентного содержания вторичных структур по спектру КД проводили при помощи веб-сервиса K2D или K2D2 (<http://www.embl.de/~andrade/k2d/>). Следует отметить, что метод КД позволяет определить лишь содержание α -спиралей [22].

АЦ образцов белка в МЭС-буфере с концентрацией 0.1–0.3 мг/мл проводили на ультрацентрифуге “Beckman E” (США), оборудованной сканером и мультиплексной оптикой при длине волны 235 нм,

+20°C и скорости вращения 55000 об/мин. Величины констант седиментации рассчитывали с помощью специальной компьютерной программы SEDFIT (<http://www.biochem.uthscsa.edu/auc/software>). Коэффициент седиментации S_{20w}^0 препаратов М1 приводили к нулевой концентрации и сравнивали с S_{20w}^0 известных глобулярных белков (химотрипсина, лизоцима и БСА) для оценки степени его компактности (глобулярности). Радиус Стокса R_S из данных по коэффициентам седиментации S_{20w}^0 рассчитывали с помощью программы Sednterp (<http://www.jphilo.mailway.com/>). Теоретические гидродинамические объемы для глобулярных белков V_h^G , “расплавленной глобулы” V_h^{PG} и “беспорядочного клубка” V_h^{BK} для последовательности из N остатков рассчитывали согласно эмпирическим формулам Уверского [8]: $\log(V_h^G) = (2.197 \pm 0.037) + (1.072 \pm 0.015) \times \log(N)$, $\log(V_h^{BK}) = (1.997 \pm 0.0078) + (1.498 \pm 0.035) \times \log(N)$ и $\log(V_h^{PG}) = (2.46 \pm 0.13) + (1.020 \pm 0.053) \times \log(N)$. Соответствующие радиусы Стокса получали из величины V_h по формуле $V_h = 4/3 R_S^3$.

ДЛС. Гидродинамический диаметр D_h препаратов определяли на приборе Zetasizer Nano ZS (MALVERN Instruments LTD, Англия) при угле рассеяния 173° с помощью прилагаемого программного обеспечения. Перед измерением препараты белка М1 в

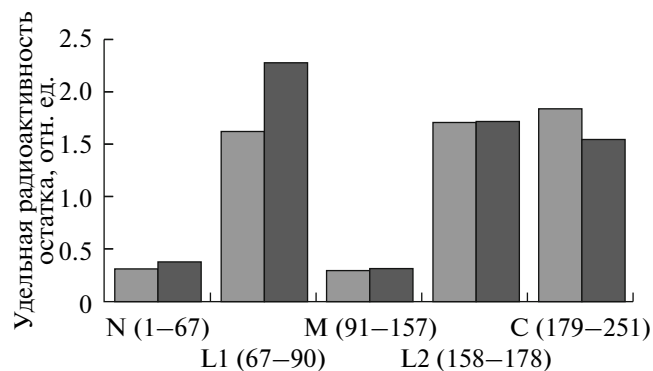


Рис. 1. Распределение радиоактивной метки по доменам белка M1 ВГ штамма A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Приведены результаты двух экспериментов.

МЭС-буфере с концентрацией 0.1–0.3 мг/мл центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин (22R Beckman Coulter centrifuge). Измерения проводили при комнатной температуре в пластиковых кюветах малого объема (0.4 мл). Анализировали либо распределение по числу частиц данного размера в препаратах, либо по объему, занимаемому частицами данного размера.

УФ-спектроскопия. Спектры поглощения белка M1 в МЭС-буфере с концентрацией 0.05–0.5 мг/мл измеряли в кюветах с длиной оптического пути 0.2–1.0 см на двухлучевом спектрофотометре “Shimadzu UV-1601” (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Япония) в области 190–350 нм. Истинное поглощение вычисляли по методу экстраполяции [23], концентрацию M1 белка – используя коэффициент экстинкции $A_{280}^{0.1\%} = 0.457$, определенный с помощью программы Sednterp.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе метод ТП [13, 14] позволил оценить включение тритиевой метки в белок M1 в кислой среде. Эта величина пропорциональна площади доступной тритию поверхности белка и отражает его пространственную структуру. Бомбардировке потоком атомарного трития подвергали раствор белка M1 ВГ штамма A/Puerto Rico/8/34 в МЭС-буфере (см. “Экспериментальная часть”). После очистки препарата, фрагментации на пептиды, гидролиза и определения удельной радиоактивности аминокислот мы проанализировали распределение тритиевой метки по первичной структуре белка (рис. 1). При рассмотрении областей первичной структуры, соответствующих доменам N(1–66), M(91–157), C(179–252) и междоменным петлям L1(67–90), L2(158–178), обнаружили значительное различие в распределении тритиевой метки по доменам. На рис. 1 видно, что для двух проведенных экспериментов средняя

нормированная радиоактивность остатка минимальна в N- и M-доменах – 0.32, 0.38 и 0.30, 0.32 соответственно. Доступность атомарному тритию остатков в C-доме в 5 раз выше (1.55, 1.84) и сравнима с доступностью петлевых областей L1(67–90) и L2(158–178). Очевидно, что высокое мечение C-домена может быть объяснено слабой структурированностью и большей стерически доступной для трития поверхностью.

Мы подтвердили наличие слабо структурированного домена в белке M1 с помощью ряда других физико-химических методов. Можно предположить, что низкая плотность упаковки C-домена должна привести к увеличению размера белка. Гидродинамические характеристики полноразмерного белка M1 в кислом МЭС-буфере определяли с помощью АЦ. В качестве маркеров использовали известные глобулярные белки, молекулярные массы которых изменяются от 14 до 132 кДа. Гидродинамические параметры этих белков и белка M1, рассчитанные с помощью специализированной компьютерной программы *SEDFIT*, суммированы в табл. 2. Согласно теории, для правильной сферической частицы $S_{\text{сферы}} = 0.012 M^{2/3}(1 - \nu\rho_0)/\nu^{1/3}$ [24], где S – коэффициент седиментации, M – молекулярная масса, ν , ρ_0 – парциальный объем и плотность соответственно. В наших экспериментах зависимость $S_{20w} \nu^{1/3}/(1 - \nu\rho_0)$ от молекулярной массы M для четырех исследованных белков в двойных логарифмических координатах имела вид прямой линии с углом наклона 2/3, характерным для глобулярных белков (табл. 2). Однако данные, полученные для белка M1, не совпадали с расчетными. Определяемая константа седиментации ($2.21S$) была существенно меньше теоретической для глобулярного белка длиной в 252 остатка ($S_{\text{max}} = 3.15S$). Рассчитанные на основании данных АЦ экспериментальные величины радиуса Стокса (R_S) для маркерных белков 25–130 кДа близки к теоретическим, рассчитанным по эмпирической формуле [8] для глобулярных белков (см. “Экспериментальная часть”), отличие составляет всего лишь $5.5 \pm 2.5\%$. В случае белка M1 величина радиуса Стокса ($R_S = 2.94$ нм) выше расчетной для глобулярного белка такой массы ($R_S^{\Gamma} = 2.42$ нм), более того выше и радиуса “растопленной глобулы” ($R_S^{\text{PG}} = 2.69$ нм) [8]. По расчетам величина R_S для полностью развернутого белка длиной в 252 остатка должна составлять 4.54 нм. Увеличенный гидродинамический радиус указывает на частично развернутое состояние белка M1 в растворе, наличие НС в его структуре. Это нашло подтверждение в данных ДЛС препаратов белка M1 в МЭС-буфере. Определяемая с помощью ДЛС величина гидродинамического диаметра D_H частиц белка M1 (5.6 ± 1.5 нм по числу частиц и 6.5 ± 2.3 нм по объему, рис. 2a) близка к полученной по данным АЦ ($2.9 \times 2 = 5.8$ нм). В работе [7] на основа-

Таблица 2. Гидродинамические параметры для ряда белков, вычисленные по данным скоростного ультрацентрифугирования с помощью программы SEDFIT

Белок	Расчет по первичной структуре		Экспериментальные данные		
	истинная мол. масса, кДа	радиус Стокса R_{st}^* , нм	коэффициент седиментации, S_{20w}^0 , S^{**}	радиус Стокса, R_{st}^{***} , нм	расчетная мол. масса по S_{20w}^0 , кДа
Лизоцим	14.3	1.90	2.17	1.61	16.8
Химотрипсिनоген	25.7	2.39	2.55	2.47	25.6
БСА	66.4	3.31	4.67	3.48	62.5
БСА димер	132.8	4.24	7.1	4.58	117.1
Препарат М1	27.9	2.42	2.21	2.94	21.4

* Рассчитано для глобулярного состояния по формуле Уверского [8].

** Аппроксимация к нулевой концентрации S_{20w}^0 из 3–6 опытов, $R_2 = 0.8$.

*** Определено по S_{20w}^0 с помощью программы Sednter.

нии данных малоуглового нейтронного рассеяния определен радиус вращения ($R_H = 2.9$ нм) полноразмерного рекомбинантного белка М1, величина которого совпадает с определенной нами методом АЦ (2.94 нм). Авторы этой работы отмечают, что такой радиус R_H много больше, чем ожидаемый для компактного глобулярного белка той же массы и высказывают предположение, что белок М1 имеет форму вытянутого мономера.

Чтобы оценить структурированность белка, мы также измеряли его спектры КД в дальнем УФ-свете в кислом МЭС-буфере. Спектр КД для препарата М1 концентрации 0.2 мг/мл имел отрицательный максимум в районе 208 нм с коэффициентом молярной эллиптичности равным -12800 град \times см² \times дмоль⁻¹ (рис. 2б). Поскольку в кристалле NM-домен белка М1 представляет собой плотно упакованную структуру с содержанием α -спиралей около 70% [6], мы предположили, что высокая концентрация белка может повлиять на его конформацию и привести к увеличению спиральности. Действительно, сходной формой спектра и положением отрицательного максимума обладал и спектр КД концентрированного препарата (~10 мг/мл), но значение отрицательного максимума было выше: коэффициент молярной эллиптичности для него составил примерно -14800 град \times см² \times дмоль⁻¹. Это может указывать на изменение конформации при самоассоциации белка М1, приводящей к существенной упорядоченности его структуры. Предварительные данные показали рост его структурированности также при добавлении 40%-ного трифторэтанола до 75% (в полтора раза), что косвенно подтверждает наличие развернутых областей (данные не приведены).

Чтобы объяснить полученные результаты, мы привлекли ряд программ предсказания неупорядоченных участков в белках [12]. Недавно проведен сравнительный анализ неупорядоченности вирусных матриксных белков [25]. Проанализированы только белки с пространственной структурой, известной по данным РСА. Среди объектов был и N-концевой фрагмент матриксного белка М1 вируса гриппа (H5N1), для которого использованные программы предсказали разную степень разупорядоченности: PONDRA@VLXT – 25% и PONDRA@VL3 – 0%. В нашей работе для изучения структурных свойств цельного полноразмерного белка М1 ВГ А и В использовали ряд других доступных в интернете программ (№ 1–6, табл. 2). Эти программы можно разделить на 2 группы по принципу их работы. Программы № 1, 4, 6 предсказывают НС в белках, основываясь на физико-химических свойствах составляющих их аминокислот. Программы № 2, 3, 5 используют сравнение гомологичных белковых последовательностей [12].

На первом этапе мы определили долю НС в N(1–159)- и C(160–252)-сегментах белка М1. В табл. 1 эти величины, полученные различными программами, сгруппированы по убыванию предсказанной процентной доли НС в С-домеене белка. Все использованные программы предсказывают лишь незначительную долю НС в последовательности 1–159, порядка 4–15%. Однако в последовательности 160–252 все программы предсказывают высокий уровень разупорядоченности – от 29 (FoldIndex) до 66% (IUPred). Таким образом, C(160–252)-фрагмент белка должен быть существенно более разупорядочен, чем NM-фрагмент. При этом средняя величина неупорядоченности для всего белка М1 должна составлять около 20%.

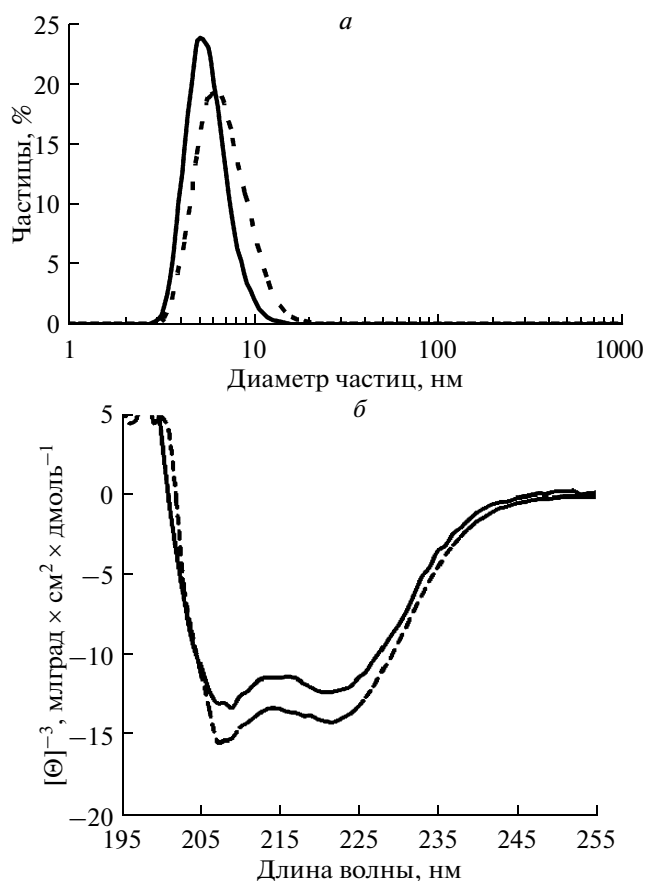


Рис. 2. Характеристика препаратов белка М1 ВГ штамма А/Puerto Rico/8/34 (Н1N1). *а* – Распределение по числу частиц данного размера в препаратах (сплошная линия) и по объему, занимаемому частицами данного размера (прерывистая линия), данные ДЛС. *б* – Спектры КД двух концентраций белка М1 в МЭС-буфере: сплошная и прерывистая линия – 0.2 и 9.8 мг/мл соответственно.

На следующем этапе работы провели анализ распределения НС (рис. 3) по первичной структуре белка М1 ВГ штамма А/Puerto Rico/8/34 (Н1N1). На рисунке приведено также расположение α -спиралей, определенное методом РСА для NM-фрагмента М1 [6]. Обращает на себя внимание тот факт, что большинство использованных алгоритмов выявляет расплетенные области в петлевых межспиральных участках между доменами N, M, C и в области C-концевого фрагмента (остатки 160–252). Эти данные хорошо коррелируют с результатами включения тритиевой метки (см. рис. 1) при бомбардировке препарата белка М1 в кислом МЭС-буфере. Места повышенного включения трития близки к предсказанным областям неупорядоченности. Очевидно, аминокислотные остатки в таких областях должны быть доступнее различным химическим пробам и протеазам, чем остатки в компактных глобулярных доменах.

В настоящее время установлено, что М1 как многофункциональный белок играет ключевую роль в контроле транспорта РНП комплекса ВГ в клетке и в сборке вирионов. Эти функции обеспечиваются посредством целого набора различных белок-белковых взаимодействий [3–5]. Однако все еще точно не определено, какие домены и последовательности белка М1 вовлечены в эти разнообразные взаимодействия. Имеющиеся данные РСА в сочетании с результатами экспериментального изучения структурно-функциональных характеристик мутантных форм белка М1 и его фрагментов позволили выявить роль N- и M-доменов в олигомеризации белка, его взаимодействия с липидной мембраной и другими белками-партнерами [26]. Показано, что самополимеризация белка осуществляется преимущественно за счет взаимодействий гидрофобных последовательностей внутри M-доменов, а взаимодействие с липидной мембраной опосредуется как M-, так и N-доменом [26]. О функциях C-домена белка М1 ВГ практически ничего не было известно, а имеющиеся данные неполны и противоречивы. Как считается, C-домен белка М1 отщепляется в процессе кристаллизации, и в свободном состоянии неустойчив к протеолизу [6, 7], что также может объясняться его неструктурированностью. Известно, что мутации в белке М1 при адаптации к мышам штаммов ВГ А и В происходят в основном в коротком участке C-домена (207–245) [27]. Для НС белков характерна низкая консервативность их последовательностей [12]. Анализ последовательностей белка М1 различных изолятов ВГ типа А показывает его высокую консервативность, при этом наибольшая вариабельность по последовательности М1 характерна для M- и C-доменов – ~5%, тогда как в N-домене она составляет всего 1.5% [28]. Структуру полноразмерного белка М1, включающую разрешенные координаты C-концевого домена, еще предстоит определить. Тем не менее, модель, предложенная в работе [29], предполагает, что этот домен белка М1 лежит вне плоскости, образующей ленточную спираль из N + M-доменов и направлен внутрь вириона. По данными экспериментов тритиевой бомбардировки вирионов [13] и препаратов М1 в кислом растворе C-домен включает значительную тритиевую метку. Исходя из этого, можно выдвинуть предположение о том, что именно мало структурированный C-домен, в отличие от M- и N-доменов, участвует во взаимодействии с какими-либо субстратами клетки или вириона, но не участвует в жестких взаимодействиях М1-М1 в олигомерном слое, лежащем под липидной мембраной.

Таким образом, биоинформатический анализ первичной структуры вместе с данными ТП, КД, динамического светорассеяния и АЦ позволил выявить неструктурированные области в белке М1. Установлено, что значительная их доля локализуется в C-концевом фрагменте белка. Мы надеемся проверить это в следующих работах, используя ген-

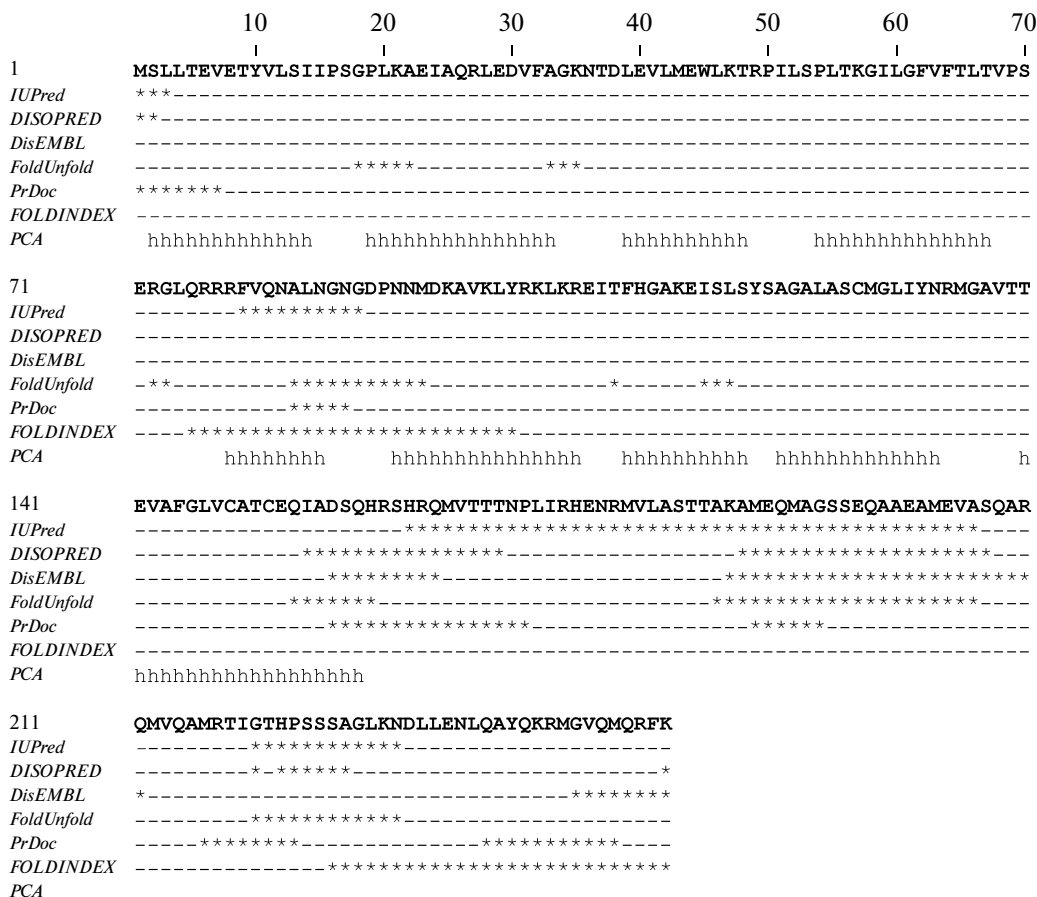


Рис. 3. Сравнительный анализ распределения НС по первичной структуре белка М1 ВГ штамма А/Puerto Rico/8/34 (H1N1), рассчитанных с помощью различных программ, и элементов вторичной структуры, определенных с помощью PCA (остатки 2–158) [6].

* Предсказанные неупорядоченные остатки; h – α-спирали.

но-инженерные фрагменты белка М1. По нашему предположению, полифункциональность белка М1 в процессе инфицирования клетки связана с его пластичной третичной структурой, возникающей за счет наличия неструктурированных областей.

Авторы благодарят П.В. Калмыкова за проведение аналитического центрифугирования, А.В. Шишкова и В.Н. Орлова за плодотворную дискуссию.

Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (09-03-00469, 09-04-01160 и 09-03-00819).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fujiyoshi Y., Kume N.P., Sakata K., Sato S. 1994. Fine structure of influenza A virus observed by electron cryo-microscopy. *EMBO J.* **13**, 318–326.
 2. Calder L.J., Wasilewski S., Berriman J.A., Rosental P.B. 2010. Structural organization of a filamentous influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 10685–10690.
 3. Ali A., Avalos R.T., Ponimaskin E., Nayak D.P. 2000. Influenza virus assembly: effect of influenza virus gly-

coproteins on the membrane association of M1 protein. *J. Virol.* **74**, 8709–8719.

4. Whittaker G., Bui M., Helenius A. 1996. The role of nuclear import and export in influenza virus infection. *Trends Cell Biol.* **6**, 67–71.
 5. Avalos R.T., Yu Z., Nayak D.P. 1997. Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells. *J. Virol.* **71**, 2947–2958.
 6. Sha B., Luo M. 1997. Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 239–244.
 7. Arzt S., Baudin F., Barge A., Timmins P., Burmeister W.P., Ruigrok R.W.H. 2001. Combined results from solution studies on intact influenza virus M1 protein and from a new crystal form of its N-terminal domain show that M1 is an elongated monomer. *Virology.* **297**, 439–446.
 8. Uversky V.N. 2002. Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics. *Protein Sci.* **11**, 739–756.
 9. Сердюк И.Н. 2007. Структурированные белки и белки с внутренней неупорядоченностью. *Молекуляр. биология.* **41**, 297–313.

10. Sickmeier M., Hamilton J.A., LeGall T, Vacic V., Cortese M. S., Tantos A., Szabo B., Tompa P., Chen J., Uversky V.N., Obradovic Z., Dunker A.K. 2007. DisProt: The database of disordered proteins. *Nucleic Acids Res.* **35**, 786–793.
11. Галзитская О.В., Гарбузинский С.А., Лобанов М.Ю. 2006. Предсказание нативно-развернутых участков белковой цепи. *Молекуляр. биология.* **40**, 341–348.
12. Ferron F., Longhi S., Canard B., Karlin D. 2006. A practical overview of protein disorder prediction methods. *Proteins.* **65**, 1–14.
13. Shishkov A.V., Goldanskii V.I., Baratova L.A., Fedorova N.V., Ksenofontov A.L., Zhirnov O.P., Baratova L.A., Galkin A.V. 1999. The in situ spatial arrangement of the influenza A virus matrix protein M1 assessed by tritium bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 7827–7830.
14. Богачева Е.Н., Долгов А.А., Чуличков А.Л., Шишков А.В., Бадун Г.А., Ксенофонтов А.Л., Федорова Н.В., Баратова Л.А. 2010. Особенности структуры белка М1 в растворе. *Перспективные материалы.* **8**, 148–154.
15. Bogacheva E.N., Goldanskii V.I., Shishkov A.V., Galkin A.V., Baratova L.A. 1998. Tritium planigraphy: from the accessible surface to the spatial structure of a protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 2790–2794.
16. Zhirnov O.P. 1992. Isolation of matrix protein M1 from influenza viruses by acid-dependent extraction with nonionic detergent. *Virology.* **186**, 324–330.
17. Dosztanyi Z., Csizmok V.P., Tompa P., Simon I. 2005. IUPred: Web server for the prediction intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics.* **21**, 3433–3434.
18. Ward J.J., McGuffin L.J., Bryson K., Buxton B.F., Jones D.T. 2004. The DISOPRED server for the prediction of protein disorder. *Bioinformatics.* **20**, 2138–2139.
19. Linding R., Jensen L.J., Diella F., Bork P., Gibson T.J., Russell R.B. 2003. Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure.* **11**, 1316–1317.
20. Ishida T., Kinoshita K. 2007. PrDOS: prediction of disordered protein regions from amino acid sequence. *Nucleic Acids Res.* **35**, 1–5.
21. Prilusky J., Felder C.E., Mordehai T., Rydberg E., Man O., Beckmann J.S., Silman I., Sussman J.L. 2005. FoldIndex©: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics.* **21**, 3435–3438.
22. Sreerama N., Woody R.W. 2004. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods Enzymol.* **383**, 318–351.
23. Ксенофонтов А.Л., Козловский В.С., Кордюкова Л.В., Радюхин В.А., Тимофеева А.В., Добров Е.Н. 2006. Определение концентрации и размера агрегатов в препаратах вируса гриппа по спектрам истинного поглощения в УФ-свете. *Молекуляр. биология.* **40**, 172–179.
24. Cantor Ch.R., Shimmel P.R. 1984. *Biophysical Chemistry.* **2**, San Francisco: Freeman and Company.
25. Goh G.K., Dunker A.K., Uversky V.N. 2008. A comparative analysis of viral matrix proteins using disorder predictors. *Viol. J.* **5**, 1–10.
26. Noton S.L., Medcalf E., Fisher D., Mullin A.E., Elton D., Digard P. 2007. Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *J Gen. Virol.* **88**, 2280–2290.
27. McCullers J.A., Hoffmann E., Huber V.C., Nickerson A.D. 2005. A single amino acid change in the C-terminal domain of the matrix protein M1 of influenza B virus confers mouse adaptation and virulence. *Virology.* **336**, 318–326.
28. Кузнецова М.А., Пеков Ю.А., Ксенофонтов А.Л., Кордюкова Л.В., Друца В.Л. 2010. Оценка эволюционной стабильности вируса гриппа типа А. Предсказание переменных участков в доменной структуре белка М1. *Вестник МГУ. Сер. биология.* **65**, 104–106.
29. Harris A., Forouhar F., Qiu S., Sha B., Luo M. 2001. The crystal structure of the influenza matrix protein M1 at neutral pH: M1-M1 protein interfaces can rotate in the oligomeric structures of M1. *Virology.* **289**, 34–44.