

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ХРОМОБЕЛКА ИЗ *CONDYLACTIS GIGANTEA*

Гарковенко А.В.¹, Пахомов А.А.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук», Москва, Россия (117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10), e-mail: a_garkov@ibch.ru

Данные о структуре белка играют ключевую роль в понимании его функционирования. При анализе механизмов синтеза хромофора в GFP-подобных белках наибольшую ценность представляют данные о микроокружении образующегося хромофора. Недавно нами было показано, что метод гомологичного моделирования можно использовать для расчета пространственной структуры флуоресцентных белков (ФБ) GFP-семейства. В данной работе этот метод был применен для моделирования структуры хромобелка из кораллового полипа *Condylactis gigantea* (cgCP). Было проанализировано аминокислотное окружение хромофора. Именно аминокислотное окружение во флуоресцентных белках формирует специфическую полость для хромофора и создает особые, характерные для ФБ, стерически напряженные состояния, а также выполняет каталитическую роль. Полученные данные об окружении хромофора могут объяснить некоторые особенности созревания cgCP.

Ключевые слова: гомологичное моделирование, структура белка, хромобелки.

3D STRUCTURE MODELLING OF A CROMOPROTEIN FROM *CONDYLACTIS GIGANTEA*

Garkovenko A.V.¹, Pakhomov A.A.¹

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Science, Moscow, Russia (117997, Moscow, Miklukho-Maklaya 16/10), e-mail: a_garkov@ibch.ru

Information about protein structure plays a pivotal role in understanding of its functioning. In GFP-like proteins microenvironment of forming chromophore is of special interest in analysis of its synthesis mechanism. We have shown recently that homology modelling can be used for calculation of fluorescent proteins (FP) 3D structure. In the present work this method was applied for structure modelling of a chromoprotein from stony coral *Condylactis gigantea* (cgCP). Amino-acids environment forms specific cavity for the chromophore, creates characteristic for FPs sterically tense states and plays a catalytic role. The data on the chromophore environment in cgCP allow to explain several peculiarities in its maturation.

Keywords: homology modeling, protein structure, chromoproteins.

Введение

Генетически кодируемые флуоресцентные зонды на основе GFP-подобных белков в последнее десятилетие стали одним из основных инструментов, используемых при исследовании живых систем. Свою популярность они приобрели, прежде всего, за счёт того, что флуоресцентные свойства белок приобретает в ходе посттрансляционных модификаций, происходящих автокаталитически внутри молекулы белка [4]. То есть спектральные свойства задаются исключительно аминокислотной последовательностью, и для формирования флюорофора не нужно присутствие простетических групп. Ген GFP (Green Fluorescent Protein, зеленый флуоресцентный белок) был клонирован в 1992 г. При помощи мутагенеза на основе GFP удалось получить ряд белков с суммарной эмиссией от голубого до желтого цвета (440–539 нм) [7]. Открытие GFP-подобных белков из коралловых полипов класса Anthozoa в 1999 г. позволило существенно расширить палитру флуоресцентных

белков (ФБ). Данные белки имеют степень гомологии с GFP около 26-30%, а один из клонированных белков – DsRed имел яркую флуоресценцию в красной области спектра (583 нм). Сейчас число открытых природных GFP-подобных белков расширилось до нескольких десятков [1]. В настоящее время они применяются в биотехнологии для решения широкого спектра задач – от слежения за генной экспрессией до исследований взаимодействий белков с использованием метода флуоресцентного резонансного переноса энергии (fluorescent resonance energy transfer, FRET) [8]. Особое значение имеют белки, способные флуоресцировать в дальнекрасной и инфракрасной области спектра (650–900 нм). Данное свойство позволяет преодолеть клеточную автофлуоресценцию, а также нивелировать рассеяние и поглощение света живыми тканями, что, в свою очередь, позволяет визуализировать молекулярные процессы в масштабе целого организма.

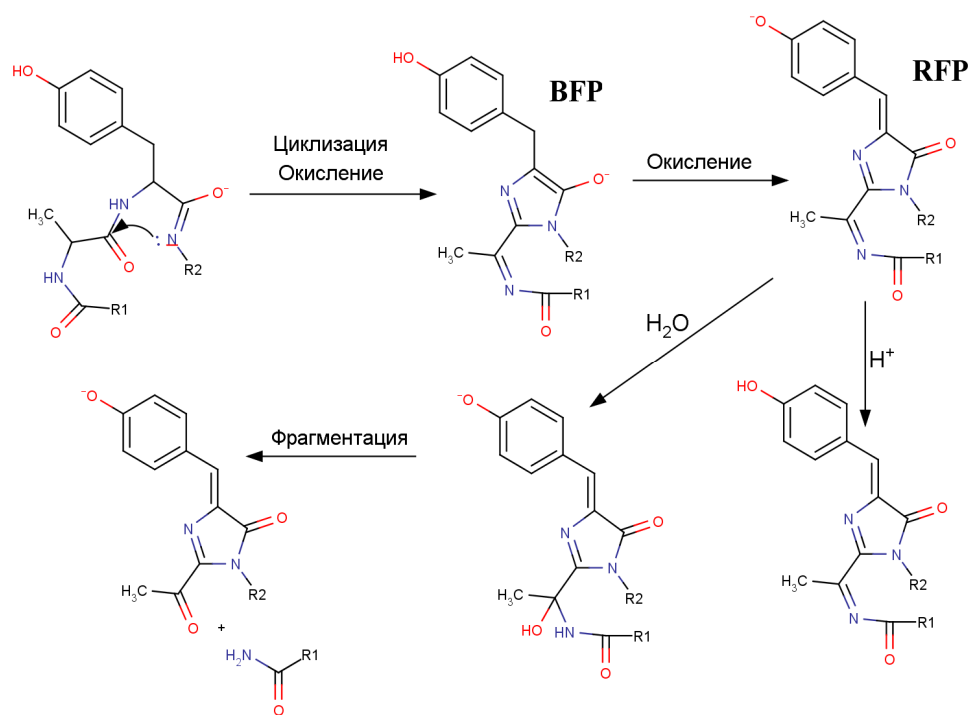


Рис. 1. Схема образования хромофора красных GFP-подобных белков (RFP, Red Fluorescent Protein) и его дальнейших модификаций (протонирования, гидролиза и фрагментации) согласно [6] и [3].

Структура хромобелка cgCP

Среди GFP-подобных белков выделяют отдельную группу хромобелков — это белки, которые не имеют собственной флуоресценции, однако характеризуются интенсивным поглощением в области спектра, характерной для дальне-красных белков (максимум эмиссии больше 600 нм). Ранее было показано, что хромобелки при помощи мутагенеза с небольшим

числом аминокислотных замен можно превратить во флуоресцентные белки [2]. Одним из важных параметров, характеризующих GFP-подобные белки, является скорость синтеза хромофора (часто говорят о скорости созревания белка в целом, так как синтез хромофора является заключительной посттрансляционной модификацией, в результате которой белок приобретает окраску). Хромобелок из кораллового полипа *Condylactis gigantea* (cgCP) является одним из самых быстросозревающих белков, поглощающих в диапазоне выше 570 нм, при этом он не образует побочных продуктов (недозрелых форм, содержащих GFP-хромофор, либо протонированный хромофор, рис. 1).

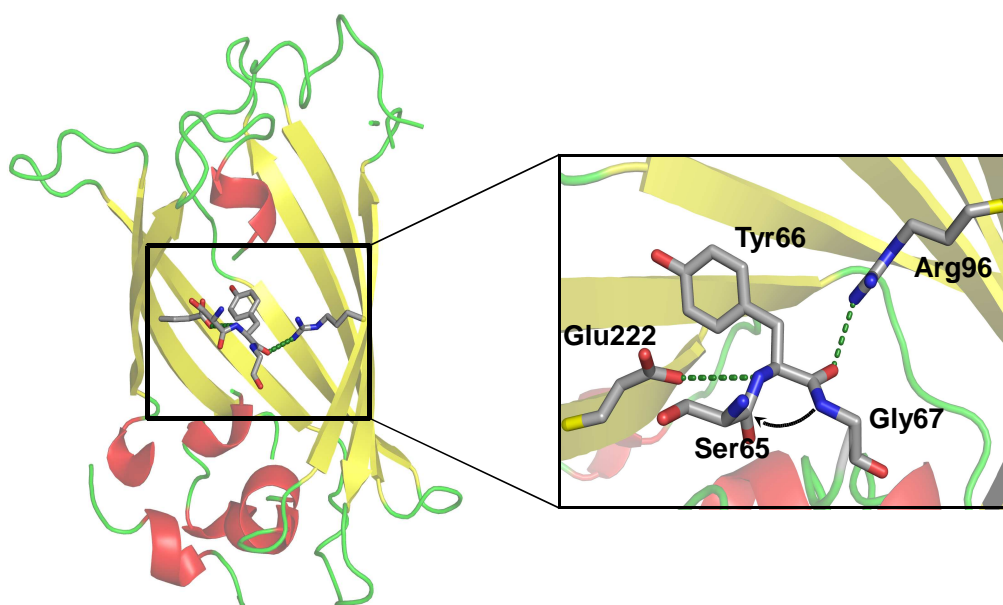
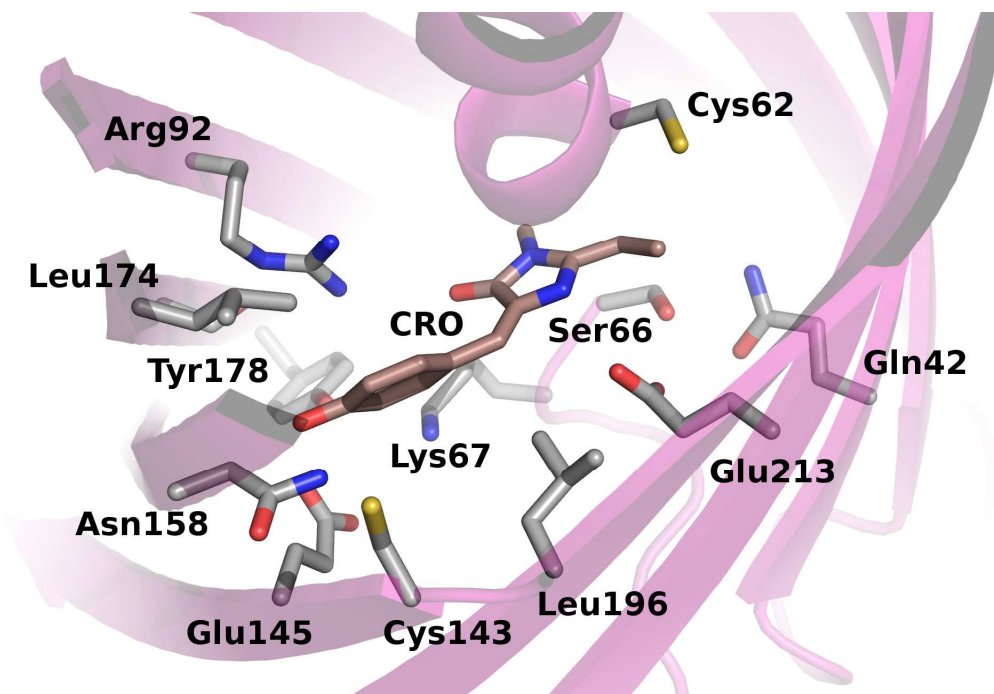


Рис. 2. Расположение формирующегося хромофора внутри β -бочки GFP, а также каталитические аминокислотные остатки Arg96 и Glu222.

Для наглядности часть β -бочки не показана.

Очевидно, что в образовании хромофора участвуют аминокислотные остатки из его ближайшего окружения. Некоторые из них выполняют каталитическую роль [4] (рис. 2). Чтобы выяснить, какие аминокислотные остатки в окружении хромофора cgCP отвечают за ускоренное созревание хромофора, нами была рассчитана пространственная структура белка. Для расчета структуры использовался программный комплекс, моделирующий пространственную структуру методом гомологичного моделирования и использующий программу MODELLER [5]. В качестве шаблона был использован близкий гомолог cgCP – хромобелок из *Heteractis crispa* (hcCP), кристаллическая структура которого известна.

Хромофор был включен в последовательность белка в виде гетерогруппы. Программа переносила хромофор в созданную модель без модификаций как жёсткое тело. На заключительной стадии моделирования структура оптимизировалась при помощи методов сопряжённого градиента и имитации отжига с молекулярной динамикой.



*Рис. 3. Ближайшее аминокислотное окружение хромофора в cgCP.
Хромофор выделен розовым цветом.*

Согласно полученной модели белок, как и другие его гомологи, имеет упаковку β -бочки с хромофором, расположенным в середине. Ключевые аминокислотные остатки расположены в тех же позициях, что и в других GFP-подобных белках. Ближайшее аминокислотное окружение хромофора очень похоже у большинства красных флуоресцентных и хромобелков, cgCP в этом плане не сильно отличается от других гомологов. В частности, в ближайшем окружении хромофора находятся характерные остатки Arg92, Glu213, Ser66, Lys67, Tyr178, Glu145 (рис. 3). Однако некоторые отличия, которые могут влиять на протекание реакций синтеза хромофора, всё же имеются. Так в 62-й позиции находится остаток Cys, который в красных белках часто заменен на Phe. Наличие Cys62 в cgCP может придавать дополнительную стерическую свободу в ходе реакции циклизации (рис. 1), а также при последующих реакциях. На подвижность хромофора значительное влияние оказывают аминокислотные остатки вблизи фенольной группы. Так, известно, что остатки 143, 158 и 196 определяют цис-транс конформационное состояние хромофора. CgCP содержит в данных позициях Cys, Asn и Leu соответственно (рис. 3). Особое внимание

обращают на себя остатки Cys143, Leu196 и Leu174. Эти остатки в других «красных» белках часто замещены на более объемные Asn, His и Phe соответственно. Таким образом, со стороны фенольного кольца хромофора в *cgCP* также возможна большая подвижность формирующегося хромофора. Высокая скорость созревания *cgCP*, в этом ключе, может быть связана с большей конформационной подвижностью формирующегося хромофора.

Другим интересным отличием *cgCP* от гомологов является наличие аланинового аминокислотного остатка в первой хромофоробразующей позиции (Ala63), что также может приводить к увеличению его подвижности. Для проверки влияния Ala63 на созревание белка были получены мутантные варианты *cgCP* с заменой Ala63 на другие аминокислотные остатки. Введение мутации в белок проводили методом сайт-направленного мутагенеза с амплификацией целой плазмиды ДНК-полимеразой *Pfu* на праймерах, содержащих необходимые мутации. В качестве матричной ДНК использовалась плазида pQE-30, несущая ген белка *cgCP*. Для того чтобы избавиться от матричной плазмиды, по окончании реакции продукт обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *Dpn I*, проявляющей специфичность к метилированной ДНК. Синтезированная в ходе реакции плазмидная ДНК, содержащая мутантный ген, не метилирована и поэтому не подвергалась расщеплению *Dpn I*, в отличие от матричной плазмиды, выделенной из *E. coli*. Затем полученной мутагенезной смесью трансформировали суперкомпетентные клетки XL-I Blue. В ходе последующего скрининга было обнаружено, что колонии, содержащие плазмиду с исходным или мутантным вариантом гена, различались по окраске, что существенно упрощало селекцию. Так, клоны, экспрессирующие мутантный белок, были окрашены менее интенсивно, по-видимому, за счёт более медленного созревания хромофора. Из отобранных клонов нарабатывали плазмидную ДНК, которую затем проверяли секвенированием на наличие вводимой мутации и сохранность остальной части гена. Биосинтез белка проводили в штамме *E. coli* JM-109, пригодном как для генно-инженерных задач, так и для экспрессии генов. Выделение и очистку *cgCP* и его мутантных вариантов проводили с использованием металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA агарозе.

В первую очередь нами была введена замена Ala63Gln, так как именно глутаминовый аминокислотный остаток наиболее часто встречается в хромобелках и красных флуоресцентных белках [1]. Данная мутация за счет увеличения размера боковой цепи 63-го остатка должна приводить к уменьшению подвижности формирующегося хромофора. В полученном мутантном белке происходило формирование «красного» хромофора с максимумом поглощения при 576 нм, однако присутствовала значительная часть белка с незрелым хромофором (вероятно, GFP-типа, максимум поглощения 520 нм). Чтобы более детально проанализировать роль 63-го остатка на выход зрелого белка, были получены и

другие мутантные варианты сgCP. В частности, получены белки с заменой Ala63Asn, Ala63His и Ala63Gly. Аминокислотный остаток Asn отличается от Gln уменьшением боковой цепи на одну метиленовую группу; His, наоборот, является более объемным; а в Gly боковая цепь вообще отсутствует. Анализ спектральных свойств полученных вариантов показал, что все замены оказывают отрицательное воздействие на выход «красного» хромофора. Причем в белке сgCP с заменой Ala63His образовывалось не более 10% полностью созревшей формы. Таким образом, увеличение объема бокового заместителя действительно может уменьшать выход зрелой формы белка. Однако обращает на себя внимание уменьшение выхода «красного» хромофора и в случае мутанта сgCP Ala63Gly. Уменьшение объема бокового заместителя первого хромофоробразующего остатка также привело к падению выхода конечной формы. В результате можно заключить, что на формирование хромофора значительное влияние, вероятно, оказывает точное расположение хромофоробразующей последовательности в каталитическом центре. То есть, помимо необходимой конформационной подвижности, важно также присутствие некоторых стерических ограничений, задающих точное расположение субстратных аминокислотных остатков в каталитическом центре.

В заключение с применением метода гомологичного моделирования в работе была получена пространственная структура хромобелка сgCP. С опорой на данные моделирования было проанализировано аминокислотное окружение хромофора сgCP. Сравнение с другими гомологами показало, что хромофор сgCP может быть конформационно более свободен, что, в свою очередь, может объяснить его высокую скорость созревания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение № 8234.

Список литературы

1. Alieva N.O., Konzen K.A., Field S.F., Meleshkevitch E.A., Hunt M.E., Beltran-Ramirez V., Miller D.J., Wiedenmann J., Salih A., Matz M.V. Diversity and evolution of coral fluorescent proteins // PLoS One, 2008, V. 3, No.7, P. e2680.
2. Gurskaya N.G., Fradkov A.F., Terskikh A., Matz M.V., Labas Y.A., Martynov V.I., Yanushevich Y.G., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins // FEBS Lett., 2001, V. 507, P. 16-20.
3. Pakhomov A.A., Pletneva N.V., Balashova T.A., Martynov V.I. Structure and Reactivity of the Chromophore of a GFP-like Chromoprotein from *Condylactis gigantea* // Biochemistry, 2006, Vol. 45, No. 23, P. 7256-7264.

4. Pakhomov A.A., Martynov V.I. GFP Family: Structural Insights into Spectral Tuning // *Chemistry & Biology*, 2008, V. 15, No. 8, P. 755-764.
5. Sali A., Blundell T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. // *J Mol Biol*, 1993, Vol. 234, P. 779-815.
6. Subach O.M., Malashkevich V.N., Zencheck W.D., Morozova K.S., Piatkevich K.D., Almo S.C., Verkhusha V.V. Structural characterization of acylimine-containing blue and red chromophores in mTagBFP and TagRFP fluorescent proteins // *Chem Biol*, 2010, Vol. 17, No. 4, P. 333-341.
7. Tsien R.Y. The Green Fluorescent protein. // *Annu. Rev. Biochem.*, 1988, V. 67, P. 509-544.
8. Wouters F.S., Varveer P.J., Bastiaens P.I.H. Imaging biochemistry inside cells // *Trends. Cell. Biol.*, 2001, V. 11, N. 5, P. 203-211.

Рецензенты:

Шуваева Т.М., д.х.н., в.н.с., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук», г. Москва.

Шахпаронов М.И., д.х.н., руководитель группы, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук», г. Москва.