

А. М. Андрианов

КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ФРАГМЕНТА 1—45 АДЕНИЛАТКИНАЗЫ КРОЛИКА НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ДВУХМЕРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ЯДЕРНОГО ЭФФЕКТА ОВЕРХАУЗЕРА

С помощью разработанного ранее расчетно-теоретического метода определены, по литературным данным двухмерной спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера, локальные структуры фрагмента 1—45 аденилаткиназы кролика в свободном и связанном с MgATP состояниях. Идентифицированы элементы вторичной структуры фрагмента и выполнен анализ конформаций его «неструктурированных» участков. Проведено сопоставление конформации фрагмента в растворе с конформацией сегмента 1—45 рентгеновской структуры аденилаткиназы свиньи. Проанализированы конформационные перестройки, происходящие при взаимодействии фрагмента с MgATP.

Введение. Фермент аденилаткиназа состоит из 194 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 21 700. Аденилаткиназа катализирует реакцию $MgATP + AMP \rightleftharpoons MgADP + ADP$ и содержит два нуклеотид-связывающих участка, один из которых отвечает за взаимодействия с MgATP и MgADP. Совместное рассмотрение данных рентгеноструктурного анализа [1] и спектроскопии ЯМР [2] позволило установить, что участок, связывающий MgATP и MgADP, локализован на фрагменте 1—45 фермента [2, 3]. Предварительные ЯМР-исследования синтетического пептида, аминокислотная последовательность которого совпадает с первичной структурой участка 1—45 аденилаткиназы кролика, показали [2], что пептид сохраняет в растворе конформацию, близкую к конформации соответствующего участка интактного фермента. Этот факт позволил провести детальные структурные исследования пептида методами двухмерной (2D) спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) [3].

В настоящей работе определены, по данным 2D спектроскопии ЯЭО, конформации полипептидной цепи синтетического фрагмента 1—45 аденилаткиназы кролика в свободном и связанном с MgATP состояниях. На основе полученных результатов идентифицированы элементы вторичной структуры фрагмента и изучены конформации его нерегулярных участков. Выполнен анализ конформационных изменений фрагмента, происходящих при его взаимодействии с MgATP.

Методы расчета. Определение конформаций фрагмента 1—45 аденилаткиназы кролика в свободном и связанном с MgATP состояниях осуществлено с помощью расчетно-теоретического метода [4—8] с привлечением в качестве исходной информации данных о наличии и отсутствии $d_{\alpha N}$ -, d_{NN} - и $d_{\beta N}$ -связей, используемых при отнесении сигналов протонов в 2D спектрах ЯЭО [9, 10]. Необходимые для этого экспериментальные данные заимствованы из работы [3]. Значения углов ϕ и ψ аминокислотных остатков участка 1—45 рентгеновской структуры аденилаткиназы свиньи рассчитаны с использованием программы [11] на основе кристаллографических координат атомов, взятых из соответствующего файла Международного банка белковых структур [12].

Результаты и обсуждение. В таблице приведены области конформационного пространства (рис. 1) аминокислотных остатков фрагмента 1—45 аденилаткиназы кролика в свободном и связанном с MgATP состояниях (I) и отвечающие им (согласно данным работ [6, 8]) наиболее вероятные значения двугранных углов ϕ , ψ (II). В таблице представлены также (колонки 8—10) соответствующие конформационные параметры фрагмента 1—45 рентгеновской структуры аденилаткиназы свиньи.

© А. М. АНДРИАНОВ, 1991

Конф. рма.ии аминокислотных остатков фрагмента 1—45 аденилаткиназы кролика, установленные на основе данных 2D спектроскопии ЯЭО

Amino acid residue conformations of the fragment 1—45 of rabbit adenylate kinase according to the 2D NOE spectroscopy data

Остаток	Фрагмент 1—45 (раствор)			Фрагмент 1—45+MgATP (раствор)			Фрагмент 1—45 (рентген)		
	I	II		I	II		I	II	
		φ	ψ		φ	ψ		φ	ψ
		град.			град.			град.	
Met-1	Q/P	-85/-60	-5	Q/P	-85/-60	-5	B	-113	104
Glu-2	Q/P	-85/-60	-5	Q/P	-85/-60	-5	R	-57	-79
Glu-3	B/T	-90	20	Q/P	-85/-60	-5	R	-30	-62
Lys-4	Q	-85	-5	Q/P	-85/-60	-5	R	-59	-42
Leu-5	Q	-85	-5	Q/P	-85/-60	-5	Q	-64	-21
Lys-6	Q	-85	-5	B	-100	135	R	-92	-59
Lys-7	B	-100	135	B	-100	135	R	-56	-65
Ala-8	B	-100	135	A	-105	160	B	-32	97
Lys-9	B	-100	135	B	-100	135	B	-10	92
Ile-10	B	-100	135	P	-60	-5	B	-114	125
Ile-11	B/T	-100	135	B/T	-100	135	B	-146	137
Phe-12	Q/P	-85/-60	-5	Q/P	-85/-60	-5	B	-91	126
Val-13	B	-100	135	P	-60	-5	B	-124	125
Val-14	B	-100	135	Q	-85	-5	B	-152	145
Gly-15	P	-60	20	P	-60	20	R	-164	-69
Gly-16	P*	60	-20	P*	60	-20	S*	169	129
Pro-17	S	-55	-35	B	-50	130	B	-27	107
Gly-18	P*	60	-20	P*	60	-20	B*	138	-109
Ser-19	B	-100	135	B	-100	135	S	-31	-106
Gly-20	S*	100	120	S*	100	120	R*	175	64
Lys-21	B	-100	135	B	-100	135	Q	-78	-16
Gly-22	B	-90	115	P	-60	20	R	-99	-72
Thr-23	Q	-85	-5	Q	-85	-5	R	-50	-44
Gln-24	R/S	-65/-40	-35/-55	R/S	-65/-40	-55	R	-47	-61
Cys-25	R/S	-65/-40	-35/-55	Q/P	-85/-60	-5	R	-54	-56
Glu-26	P	60	-5	Q/P	-85/-60	-5	R	-44	-41
Lys-27	Q	-85	-5	Q/P	-85/-60	-5	Q	-71	-20
Ile-28	Q/P	-85/-60	-5	Q/P	-85/-60	-5	Q	-95	-8
Val-29	A/K	-75	-10	A/K	-75	-10	R	-65	-55
Gln-30	B/T	-90	20	Q/P	-85/-60	-5	Q	-93	-5
Lys-31	B/T	-90	20	B/T	-90	20	R	-97	-49
Tyr-32	K/A	-75	-10	K/A	-75	-10	R	-94	-44
Gly-33	R*	100	45	R*	100	45	Q*	112	10
Tyr-34	Q	-85	-5	S	-40	-55	A	-72	179
Thr-35	B/T	-100	135	B/T	-100	135	B	-109	122
His-36	P	-60	-5	P	-60	-5	B	-78	106
Leu-37	B	-100	135	P	-60	-5	B	-112	104
Ser-38	Q/P	-85/-60	-5	Q/P	-85/-60	-5	B	-112	140
Thr-39	B/T	-90	20	Q/P	-85/-60	-5	R	-46	-52
Gly-40	P	-60	2	P	-60	20	R	-35	-55
Asp-41	Q/P	-85/-60	-5	Q/P	-85/-60	-5	R	-55	-54
Leu-42	B	-100	135	B	-100	135	R	-46	-63
Leu-43	S	-40	-55	S	-40	-55	R	-57	-54
Arg-44	B	-100	135	P	-60	-5	R	-37	-56
Ala-45	—	—	—	—	—	—	—	—	—

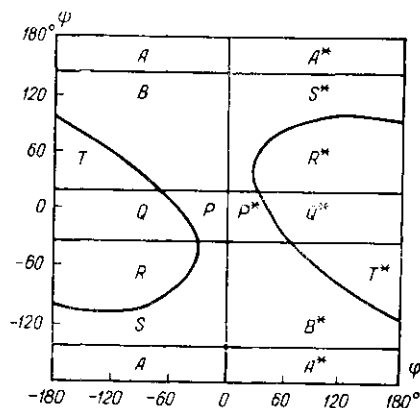
Примечание. В случае остатков, для которых в эксперименте [3] не проведены отнесения сигналов амидных протонов NH, указаны две вероятные области пространства (φ, ψ), отвечающие наличию и отсутствию соответствующей d-связи в 2D спектрах ЯЭО. Для областей Q и P, а также R и S, относящихся к соседним участкам конформационной карты (рис. 1) и характеризующихся близкими величинами наиболее вероятных углов φ, ψ [6, 8], представлены два их возможных значения. Для остатков, находящихся в областях B или T и A или K, имеющих существенно различные конформационные параметры φ, ψ [6, 8], приведены значения углов, наиболее близкие к рентгеновским. Область K отсутствует на конформационной карте (рис. 1), поскольку указанная на ней градация пространства (φ, ψ) соответствует случаю, когда верхняя граница для наблюдаемых в спектрах ЯЭО межпротонных контактов равна 0,3 нм [9]. Варьирование верхней границы в интервале ее неопределенности, обусловленной экспериментальной погрешностью определения межпротонных расстояний [13], приводит к появлению в стериически разрешенной части пространства (φ, ψ) небольшой области K, характеризующейся наличием в спектрах ЯЭО $d_{\alpha N}$, d_{NN} и $d_{\beta N}$ -связей (подробности см. в работах [4—8]).

Анализ данных, приведенных в таблице, позволяет заключить (рис. 2, *a*), что полипептидная цепь фрагмента содержит три спиралеподобных сегмента (остатки 1—6, 23—32, 38—41) и три участка с «вытянутой» конформацией (7—11, 13—14, 21—22). Остальные остатки (15—20, 33—37, 42—44) входят в состав сегментов, имеющих нерегулярную конформацию.

Сопоставление конформаций синтетического пептида в растворе и фрагмента 1—45 рентгеновской структуры аденилаткиназы свиньи (таблица) свидетельствует о том, что конформационные состояния большинства их аминокислотных остатков близки. В то же время отдельные остатки испытывают при переходе «раствор—кристалл» существенные изменения конформации, которые, однако, не приводят к значительным

Рис. 1. Области конформационного пространства (φ , ψ). Классификация областей и метод их определения по данным 2D спектроскопии ЯЭО подробно изложены в работах [4—8]

Fig. 1. Regions of the conformational space (φ , ψ). Classification of regions and method of their determination by 2D NOE spectroscopy data are described in details in articles [4—8]



перестройкам вторичной структуры сравниваемых фрагментов (рис. 2, *a*, *b*). Так, изменения конформаций остатков Met-1, Lys-7 и Phe-12 обуславливают небольшие различия вторичной структуры их N-концевой области, а конформационные переходы остатков на участке Gly-15—Gly-20, насыщенный глицинами, вообще не оказывают влияния на его конформацию (в обоих случаях для него характерна нерегулярная конформация полипептидной цепи). При сравнении фрагментов обращает на себя внимание тот факт, что конформации остатков в положениях 8 и 30 пептидной цепи, в которых различаются их аминокислотные последовательности, подобны. Основные различия (с точки зрения вторичной структуры) локализованы в С-концевой области рассматриваемых фрагментов, которая имеет в случае кристалла четко выраженную регулярную конформацию, не сохраняющуюся в растворе (сравни рис. 2, *a* и *b*).

Из анализа вторичной структуры синтетического пептида в растворе следует, что 48 % его аминокислотных остатков формируют спиралеподобные участки, для 20 % из них характерна β -структурная организация, а 32 % остатков образуют сегменты с нерегулярной конформацией. (Близкие величины характерны и для конформации фрагмента, полученной на основе предсказаний по методу Чоу — Фасмана [3].) Процентное содержание указанных вторичных структур в рентгеновской конформации участка 1—45 аденилаткиназы свиньи составляет соответственно 56, 29 и 15 %. Сопоставляя вторичные структуры фрагмента в растворе и кристалле, необходимо иметь в виду, что сегменты полипептидной цепи, имеющие в рентгеновской структуре конформации правой α -спирали, испытывают при переходе «кристалл—раствор» небольшие конформационные перестройки (переходы R→Q, P; таблица), которые приводят к искажению α -спирали и формированию спиралеподобных участков. По-видимому, этим может быть объяснен тот факт, что для рассматриваемого фрагмента характерно в растворе (согласно данным спектроскопии кругового дихроизма и инфракрасной спектроскопии с Фурье преобразованием [3]) низкое (меньше 10 %) содержание α -спиральных структур.

Сравнительный анализ конформаций пептида в свободном и связанном с MgATP состояниях показывает (таблица), что восемь аминокислотных остатков (Lys-6, Ile-10, Val-13 и 14, Pro-17, Gly-22, Leu-37, Arg-44) претерпевают в результате связывания с MgATP значительные

конформационные перестройки, приводящие к изменению его вторичной структуры (рис. 2, б). В частности, изменение конформации остатка Lys-6 укорачивает N-концевую спираль до фрагмента Met-1 — Leu-5, а переход остатка Ile-10 из «вытянутого» в «свернутое» конформационное состояние (переход В → Р) сопровождается сдвигом β-структурного участка Lys-7 — Ile-11 к остаткам Lys-6 — Lys-9 (рис. 2, а, б). Аналогичные переходы остатков Val-13 и 14 индуцируют формирование спиралеподобного фрагмента Phe-12—Val-14, отсутствующего на соответствующем сегменте пептида в свободном состоянии. Изменения конформаций остатков Pro-17, Leu-37 и Arg-44 не приводят к нарушениям

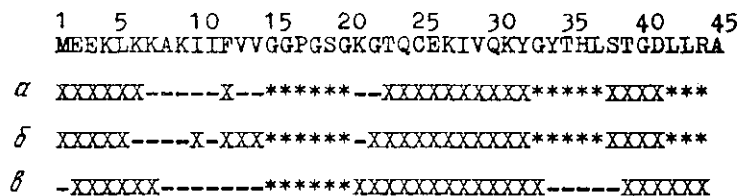


Рис. 2. Вторичная структура фрагмента 1—45 аденилаткиназы: *a* — синтетический пептид в свободном состоянии; *б* — синтетический пептид, связанный с MgATP; *в* — фрагмент 1—45 рентгеновской структуры аденилаткиназы свиньи. «X» — спиралеподобная конформация; «—» — «вытянутая» конформация; «*» — нерегулярная конформация. Аминокислотная последовательность фрагмента приведена в однобуквенном коде
 Fig. 2. Secondary structure of fragment 1-45 of adenylate kinase: *a* — synthetic peptide in free state; *б* — MgATP-bound synthetic peptide; *в* — fragment 1-45 of the X-ray structure of porcine adenylate kinase. «X» — helix-like conformation; «—» — «extended» conformation; «*» — irregular conformation. Amino acid fragment sequence is presented by one-letter code.

вторичной структуры близлежащих к ним участков цепи, поскольку в обоих случаях указанные остатки расположены в «неструктурированных» сегментах полипептидного остова.

Фрай и соавт. [3] была предпринята попытка определить локальную структуру синтетического фрагмента 1—45 аденилаткиназы кролика на основе данных 2D спектроскопии ЯЭО. Однако использованные при этом критерии позволили им качественно описать только элементы регулярной вторичной структуры фрагмента без рассмотрения конформаций остатков, входящих в нерегулярные сегменты полипептидной цепи. В отличие от работы [3] в настоящей статье для структурной интерпретации спектров ЯЭО фрагмента 1—45 аденилаткиназы кролика применен метод [4—8], эффективность которого продемонстрирована С. А. Шерманом с соавт. [14, 15] на объектах с известной пространственной структурой. В результате анализа данных спектральных измерений с помощью этого метода удалось определить конформации практически всех аминокислотных остатков фрагмента в свободном и связанном с MgATP состояниях. Это предоставило возможность проанализировать изменения его вторичной структуры, происходящие при взаимодействии с MgATP, а также выявить конформационные перестройки отдельных остатков, индуцированные изменениями условий микроокружения.

В заключение отметим, что представленные выше данные о регулярной вторичной структуре фрагмента существенно отличаются от результатов, полученных Фрай и соавт. [3]. Так, согласно [3], полипептидная цепь фрагмента 1—45 аденилаткиназы кролика содержит два α-спиральных сегмента (остатки 4—7, 23—29) и три участка с «вытянутой» конформацией (остатки 8—15, 30—32, 35—40), что не согласуется с данными, приведенными на рис. 2, а. (Различия в результатах обусловлены, вероятно, тем, что авторы работы [3] провели качественный (без использования компьютерных методов) анализ спектральных данных фрагмента, позволивший им выполнить лишь грубую дифференциацию конформационных состояний остатков с «вытянутой» и «свернутой» конформацией.) Поэтому для проверки качества определения вторичной структуры фрагмента нами был проведен дополнительный тестовый расчет его

конформации с привлечением в качестве экспериментальной информации «модельных» параметров ЯЭО, оцененных в работе [3] на основе рентген-структурных координат атомов участка 1—45 аденилаткиназы свиши. Сравнение теоретической и рентгеновской конформаций показало, что метод [4—8] позволяет провести корректное согласование спектральных и структурных параметров фрагмента и определить с удовлетворительной точностью положения всех его аминокислотных остатков в конформационном пространстве (φ , ψ): среднеквадратичное отклонение между углами φ , ψ сравниваемых конформаций составило 29° . Это дает основание утверждать, что предлагаемая нами модель адекватно описывает конформацию фрагмента 1—45 аденилаткиназы кролика, реализующуюся в растворе.

Резюме

За допомогою розробленого раніше розрахунково-теоретичного методу визначені, за літературними даними двовірної спектроскопії ядерного ефекту Оверхаузера, локальні структури фрагмента 1—45 аденилаткинази кроля у вільному і зв'язаному з MgATP станах. Ідентифіковано елементи вторинної структури фрагмента і проведено аналіз конформацій його «неструктурованих» ділянок. Також співставлені конформації фрагменту у розчині з конформацією сегменту 1—45 рентгеновської структури аденилаткинази свиші. Проаналізовано конформаційні перебудови, що відбуваються при взаємодії фрагмента з MgATP.

Summary

The conformations of a synthetic peptide corresponding to residues 1-45 of rabbit adenylyate kinase in free and MgATP-bound states were determined in terms of the two-dimensional nuclear Overhauser effect spectroscopy data using the earlier suggested method. The elements of the regular secondary structure were identified and the conformations of its irregular segments were analyzed for both peptide states. The comparison was made between peptide conformation in the solution and conformation of fragment 1-45 of the X-ray structure of porcine adenylyate kinase. The conformations of most of amino acid residues in solution and crystal form were shown to be similar. The conformational changes of the peptide caused by its interaction with MgATP were investigated using the results above.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sachsenheimer W., Schulz G. E. Two conformations of crystalline adenylyate kinase // J. Mol. Biol.— 1977.— 114, N 1.— P. 23—26.
2. Fry D. C., Kuby S. A., Mildvan A. S. NMR studies of the MgATP binding site of adenylyate kinase and of a 45-residue peptide fragment of the enzyme // Biochemistry.— 1985.— 24, N 17.— P. 4680—4694.
3. Solution structure of 45-residue MgATP-binding peptide of adenylyate kinase as examined by 2-D NMR, FTIR, and CD spectroscopy / D. C. Fry, M. Byler, H. Susi et al. // Ibid.— 1988.— 27, N 10.— P. 3588—3598.
4. Akhrem A. A., Sherman S. A., Andrianov A. M. Conformational analysis based on the data of two-dimensional ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. Proteinase isoinhibitors II A and II B from bull seminal plasma // Stud. biophys.— 1985.— 109, N 1.— P. 15—23.
5. Шерман С. А., Андрианов А. М. Определение и сравнительный анализ конформаций остова белковых молекул бычьего панкреатического ингибитора трипсина и ингибиторов трипсина Е и К на основе данных двумерной ^1H -ЯМР-спектроскопии // Молекуляр. биология.— 1985.— 19, № 5.— С. 1301—1309.
6. Шерман С. А., Андрианов А. М. Определение конформаций остова белковых молекул по данным двумерной ^1H -ЯМР-спектроскопии // Изв. АН БССР, сер. хим. наук.— 1986.— № 2.— С. 81—86.
7. Шерман С. А., Андрианов А. М. Взаимосвязь спектральных параметров ЯМР с конформационными характеристиками остова аминокислотных остатков. Анализ элементов вторичной структуры белков // Молекуляр. биология.— 1987.— 21, № 6.— С. 1573—1581.
8. Sherman S. A., Andrianov A. M., Akhrem A. A. Method of determining protein conformations by the two-dimensional nuclear Overhauser enhancement spectroscopy data // J. Biomol. Struct. and Dyn.— 1987.— 4, N 5.— P. 869—884.

9. Billeter M., Braun W., Wuthrich K. Sequential resonance assignments in protein ¹H nuclear magnetic resonance spectra. Computation of sterically allowed proton-proton distances in single crystal protein conformations // J. Mol. Biol.—1982.—155, N 3.—P. 321—346.
10. Wuthrich K. Sequential individual assignments in the ¹H-NMR spectra of polypeptides and proteins // Biopolymers.—1983.—22, N 1.—P. 131—138.
11. Дегтерева Л. Н., Ракова А. А., Шерман С. А. Комплекс программ для работы с базой рентгеноструктурных данных белков // Програм. обеспечение ЭВМ.— Минск : Изд-во Ин-та математики АН БССР, 1986.— Вып. 68.— С. 52—80.
12. The protein data bank. A computer-based archival file for macromolecular structures / F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. B. Williams et al. // Eur. J. Biochem.—1977.—80, N 2.—P. 319—324.
13. Keepers J. W., James T. L. A theoretical study of distance determinations from NMR. Two-dimensional nuclear Overhauser effect spectra // J. Magn. Reson.—1984.—57, N 3.—P. 404—426.
14. Шерман С. А., Андрианов А. М., Ахрем А. А. Конформационный анализ и установление пространственной структуры белковых молекул.— Минск : Наука и техника, 1989.— 240 с.
15. Andrianov A. M., Sherman S. A. Conformation of bovine pancreatic trypsin inhibitor in solution. Structural analysis based on two-dimensional nuclear Overhauser effect spectroscopy data // Stud. biophys.—1989.—131, N 3.—P. 161—168.

Ин-т биоорг. химии АН БССР, Минск

Получено 06.06.90

УДК 577.113+123.5

Ю. М. Константинов, М. В. Деренко, И. Б. Рогозин

КОНТЕКСТНЫЙ АНАЛИЗ ЛИНЕЙНЫХ ПЛАЗМИДОПОДОБНЫХ ДНК МИТОХОНДРИЙ КУКУРУЗЫ: ГОМОЛОГИЯ С ВИРУСНЫМИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ

С использованием контекстного анализа и банка данных нуклеотидных последовательностей установлено, что линейные S1 и S2 плазмидоподобные ДНК митохондрий кукурузы включают участки неслучайной гомологии с последовательностями пяти различных эукариотических вирусов (ретровируса птиц, флэбовируса, вируса гриппа, вируса гепатита, вируса SV40). Отмечена высокая насыщенность участков гомологии короткими олигонуклеотидными сайтами, наличие которых характерно для областей ДНК с активно идущими процессами сайт-специфической рекомбинации. Обнаруженные участки гомологии имеют длину от 60 до 130 нуклеотидных пар и входят в состав функционально важных областей вирусных геномов и плазмидоподобных ДНК митохондрий.

Введение. Плазмидоподобные, или миникольцевые ДНК (ппДНК), входящие в состав митохондриального генома многих высших растений (пшеницы, сорго, проса, подсолнечника, сахарной свеклы и кукурузы), становятся в последние годы объектом интенсивных молекулярно-биологических исследований [1, 2]. Одной из причин такого интереса является установленная экспериментально связь этих молекул с генетическим признаком «цитоплазматической мужской стерильности», имеющим важное практическое значение в сельскохозяйственном производстве гибридных семян кукурузы, сахарной свеклы и других культур [3]. Существуют также предпосылки для использования ппДНК при конструировании генетических векторов интегративного и репликативного типов в опытах по генетической инженерии растений [4]. Необходимо отметить, однако, что полученные к настоящему времени сведения о генетических функциях и биологической роли ппДНК растительных митохондрий являются весьма ограниченными. Практически невыясненными остаются вопросы эволюционного происхождения ппДНК.

В последние годы получило распространение новое направление теории анализа генетических текстов — контекстный анализ, позволяющий исследовать общие закономерности структурной организации по-

© Ю. М. КОНСТАНТИНОВ, М. В. ДЕРЕНКО, И. Б. РОГОЗИН, 1991