

Сравнительный анализ вторичной структуры тубулинов и FtsZ-белков

А. Ю. Ныпорко, Я. Б. Блюм

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 148, Киев, 03143, Украина

Проанализирована вторичная структура молекул тубулинов и FtsZ-белков из эволюционно отдаленных организмов. Выявлено, что большинство элементов вторичной структуры являются общими для всех исследуемых белков, но при этом каждый белок содержит также уникальные структурные элементы. Стабильность вторичной структуры молекул во времени четко отличается для класса тубулинов и класса FtsZ. В случае тубулинов можно говорить о присущей этим белкам динамической метастабильности вторичной структуры.

Введение. Тубулины — семейство высококонсервативных цитоплазматических белков, которые представлены во всех без исключения эукариотических клетках [1]. Молекулярная масса (м. м.) тубулинов составляет величину порядка 50—55 кДа при варьирующей длине аминокислотной последовательности в пределах 420—460 остатков. Тубулины являются основным структурным компонентом микротрубочек [2]. Внутриклеточные функции микротрубочек достаточно разнообразны и включают, в первую очередь, клеточное деление, клеточную подвижность, передвижение везикул и транспорт других макромолекулярных образований к ядру и от ядра. Существенными факторами функционирования микротрубочек являются их структурная полярность, динамическая нестабильность, обеспечиваемая процессами ассоциации—диссоциации молекул тубулина, а также взаимодействием с ассоциированными белками (БАМы) [3] и моторными белками (динеин, кинезин) [4].

Тубулины подразделяются на три основных типа: α , β и γ . Первые два принимают непосредственное участие в формировании микротрубочек, и в деполимеризованной форме тубулин существует как комплекс α - и β -субъединиц, именуемый также гетеродимером (либо просто димером). Каждый димер связывает две молекулы GTP, одну из них путем ассоциации с α -тубулином (необменный

сайт), вторую — с β -тубулином (обменный сайт) [5]. Гидролиз GTP в сайте связывания молекулы β -тубулина является обязательным условием диссоциации микротрубочек [6].

FtsZ-белки характерны для всех прокариотических организмов [7], а также для хлоропластов низших и высших растений. Эти белки с м. м. порядка 40 кДа обладают определенной гомологией аминокислотной последовательности с таковой у тубулинов [8]. Установлено, что FtsZ-белки ответственны за процессы деления бактерий и хлоропластов [9, 10]. Подобно тубулинам они способны связывать молекулы GTP и ассоциироваться в полимерные структуры филаментного типа. В частности, таким образом формируется бактериальное сократительное кольцо. Аналогично β -тубулину, FtsZ обладает GTPазной активностью [11].

Сравнение данных о пространственной структуре описанных семейств белков представляется логически обоснованной задачей, поскольку может дать представление о степени влияния эволюционных изменений в аминокислотной последовательности данных белков на их структуру и клеточное поведение. Однако такая работа наталкивается на ряд трудностей как технического, так и методологического плана. Молекулы тубулинов и FtsZ слишком велики для ЯМР-спектроскопии, а применение рентгеновской либо электронной кристаллографии ограничивается высокой сложностью получения кристаллов этих белков. И если для живого тубулина удалось получить упорядоченную

структуру антипараллельных протофиламентов [12] и проанализировать ее [13], то проблема получения кристаллов растительных тубулинов до сих пор остается неразрешимой из-за сложности выделения достаточного количества высокоочищенного белка. Работа по кристаллизации бактериального FtsZ [14] также остается единичной.

Что касается методологии, то, во-первых, анализ структуры кристаллизованных белков, и тубулинов в частности, не дает полного представления о структуре нативных белков, ибо конформация, которую белок принимает при кристаллизации, в условиях клетки обладает избыточным уровнем потенциальной энергии, и вероятность ее существования *in vivo* может быть весьма незначительной [15]. Во-вторых, такой анализ ограничивается фиксацией только одного отдельно взятого состояния и не дает полного представления об изменении структуры белка в процессе его функционирования (собственные молекулярные колебания, функциональные перестройки и т. д.). Нельзя не отметить также достаточно жесткого физического воздействия на белок в процессе кристаллизации, что в ряде случаев может привести к повреждениям нативной структуры. Однако, несмотря на перечисленные недостатки, электронная и рентгеновская кристаллография служат отличными инструментами первого приближения к пространственной структуре и, более того, их можно применять для построения моделей белков, первичная структура которых уже установлена. Базовым условием адекватности таких моделей является достаточная степень гомологии аминокислотной последовательности.

Из всего вышеизложенного можно заключить, что для получения исчерпывающего представления о структурно-функциональных особенностях белков необходимо осуществить моделирование их структуры и поведения с помощью методов молекулярной механики. Отдельные эксперименты в настоящее время широко используются благодаря бурному развитию компьютерной техники, уже позволяющей обрабатывать массивы данных в сотни тысяч атомов, и наличие той критической массы сведений о поведении атомов и молекул, являющихся достаточными для адекватного описания макросистем [16—18]. Исходя из вышесказанного, в задачу данного исследования входило: уточнение существующих моделей животных тубулинов и бактериального FtsZ, полученных в результате кристаллографических исследований, построение *de novo* моделей растительного тубулина и хлоропластного FtsZ с последующим анализом структуры данных белков в статике и динамике.

Материалы и методы. Объекты исследований. Для исследования использованы следующие белки: а) α - и β -тубулин свиньи (*Sus scrofa* L.) — коды последовательностей P38557 и P38558, 451 и 445 аминокислотных остатков соответственно; α - и β -тубулин гусиной травы (*Eleusine indica* (L.) Gaeth.) — коды O22347 и O22348, 451 и 445 аминокислотных остатков; бактериальный FtsZ из *Methanococcus jannaschii* — код Q57816; хлоропластный белок деления арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.) — код O82533, 397 остатков. Выбор животных тубулинов и бактериального FtsZ обусловлен имеющимися данными по пространственной структуре их кристаллов; выбор растительных тубулинов — наличием у гусиной травы природного биотипа, являющегося высокорезистентным по отношению к двум классам веществ — динитроанилинам и фосфоамидам, — которые являются высокоспецифичными эффекторами именно по отношению к тубулинам растительного происхождения [19]. Устойчивость обусловлена заменой Thr на Ile в положении 239 [20, 21]. Был высказано предположение о том, что подобная единичная замена может оказывать заметное влияние на распределение вторичной структуры молекулы в целом.

Сравнительное выравнивание первичных последовательностей. Последовательности выбранных белков получены из базы данных SWISS-PROT [22]. В процессе дальнейшей работы их выравнивали и анализировали с помощью программы ClustalX [23].

Моделирование пространственной структуры. Для моделирования пространственной структуры молекул α - и β -тубулинов гусиной травы и хлоропластного FtsZ арабидопсиса использованы их первичные последовательности, указанные выше. Моделирование проводили с помощью сравнительного (профильного) метода [24]. В качестве матриц для приближения третичной структуры использовали кристаллические модели α - и β -тубулинов свиньи (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb>, код 1TUB) и бактериального FtsZ *M. jannaschii* (Protein Data Bank, код 1FSZ). Первичные модели построены с применением программного пакета HyperChem 5.02 [25]. При помощи функции Select осуществляли маркировку соответствующих аминокислот, после чего производили их замену с помощью функции Mutate меню Databases.

Сольватация молекул. Для имитации внутриклеточных условий молекулы размещали в водную среду с помощью модулей editconf и genbox программного пакета GROMACS [26]. Размер водного окружения определялся размерами исследуемых молекул и варьировал от $68,04^3$ до $82,7^3 \text{ \AA}^3$.

Оптимизация структуры и молекулярная динамика. Геометрию молекул оптимизировали путем минимизации потенциальной энергии с помощью модулей *grompp* и *mdrun* программного пакета GROMACS. Модуль *grompp* (*gromacs preprocessor*) генерирует набор рабочих параметров для последующих процедур оптимизации геометрии, молекулярного рестрейнинга и молекулярной динамики. Для оптимизации использовали алгоритм крутого спуска (*steepest descent*) при максимальном количестве шагов 1000 и градиенте 0,1. Энергию минимизировали с использованием силового поля *ffgmx* — стандартного силового поля GROMACS. Процедуру молекулярного рестрейнинга осуществляли с применением указанных выше модулей при температуре 300 К на протяжении 0,2 пс. Сообщения об ошибках в структуре молекул в течение работы программы отсутствовали. Молекулярные колебания изучали на протяжении 1,5 пс при температуре 300 К.

Обработка и анализ данных. Вторичную структуру анализировали, используя стандартную программу детектирования вторичной структуры *dssp* [27]. Матрицы зависимости вторичной структуры от времени колебания генерировали с помощью модуля *do_dssp* пакета GROMACS. Анализ трехмерной структуры и характера упаковки осуществляли с помощью программ *Swiss PDBViewer* [28].

Результаты и обсуждение. В ходе сравнения первичной структуры исследуемых белков выявлен ряд консенсусных положений, являющихся общими для всей группы, а также ряд консенсусов, характерных по отдельности для класса тубулинов и для класса FtsZ-белков. Общим для всех белков является участок аминокислотной последовательности 145—152 (согласно выравненной нумерации) и единичные аминокислоты в позициях Glu-22, Arg-64, Gly-99, Ala-108, Gly-110, Gly-115, Pro-179, Asp-203, Asn-210, Gly-250, Asp-253, Asp-255, что позволяет сделать вывод о высокой эволюционной консервативности данных положений. Аминокислотные последовательности, консервативные внутри каждого исследуемого класса, представлены на рис. 1. Степень полной гомологии внутри классов составляет 36 % для тубулинов и 40 % для FtsZ. Однако степень частичной гомологии, являющаяся определяющим фактором для гомологии трехмерной структуры, весьма высока и составляет 72 % для тубулинов и 74 % для FtsZ.

Трехмерная структура белков, представленная на рис. 2, показывает, что упаковка всех исследуемых молекул носит в целом сходный характер — два дифференцированных складчатых слоя, окру-

женных снаружи спиральными элементами. Отличительными чертами обоих FtsZ является более компактный характер укладки их молекул, а также наличие неупакованных фрагментов в области N-конца, размер которых достигает 37 аминокислотных остатков. Наличие неупакованных C-концевых фрагментов является характерной особенностью обоих исследуемых семейств. У тубулинов эти районы вовлечены во взаимодействие с моторными белками [29], и можно предположить, что свободные фрагменты FtsZ также участвуют в этих процессах.

Сравнительный анализ динамики вторичной структуры исследованных белков представлен в таблице. Нумерация приведена согласно выравниванию первичных последовательностей. Тип структуры обозначен в колонках с индексом «стр.», структурные элементы — буквами H (helix, спираль) и S (sheet, складки). Стабильные участки структурных элементов выделены темно-серым цветом, нестабильные — светло-серым. Звездочками отмечены аминокислоты, общие для всех белков. Таблица демонстрирует вполне определенное сходство элементов вторичной структуры. Однако следует отметить, что элементы вторичной структуры тубулинов обладают выраженной метастабильностью, характеризующейся наличием переходов ряда аминокислот складок и спиралей в неупорядоченные структуры и обратно. Количество структурных элементов варьирует у разных белков. Так, у α -тубулина устойчивого биотипа гусиной травы присутствует максимальное количество этих элементов — 19 спиральных и 11 складчатых участков, а у FtsZ метанококка оно минимально — 12 спиралей и 13 складок. Важно подчеркнуть, что основная масса структурных элементов являются общими либо расположенными в перекрывающихся областях. Можно четко отследить два района, обладающих гомологией вторичной структуры. Первый — расположен в области от 94 до 276 аминокислотных остатков, согласно сводной выравненной нумерации, и содержит по четыре спиральных и четыре складчатых компонента. Второй — меньший, локализуется на участке 326—342 и содержит одну спираль.

Ряд структурных элементов являются уникальными для каждого из белков: H2 — для α -тубулина устойчивого биотипа *E. indica*; S11 и S12 — для β -тубулина *E. indica*; H1, S12 и S13 — для бактериального FtsZ. Некоторые элементы характерны для групп белков: H1- и S1-структуры в районе N-конца характерны для всех тубулинов, так же как H2(H4) и S2 в области 65—79 аминокислотных остатков и S8(S9) в области 316—324. Интересной

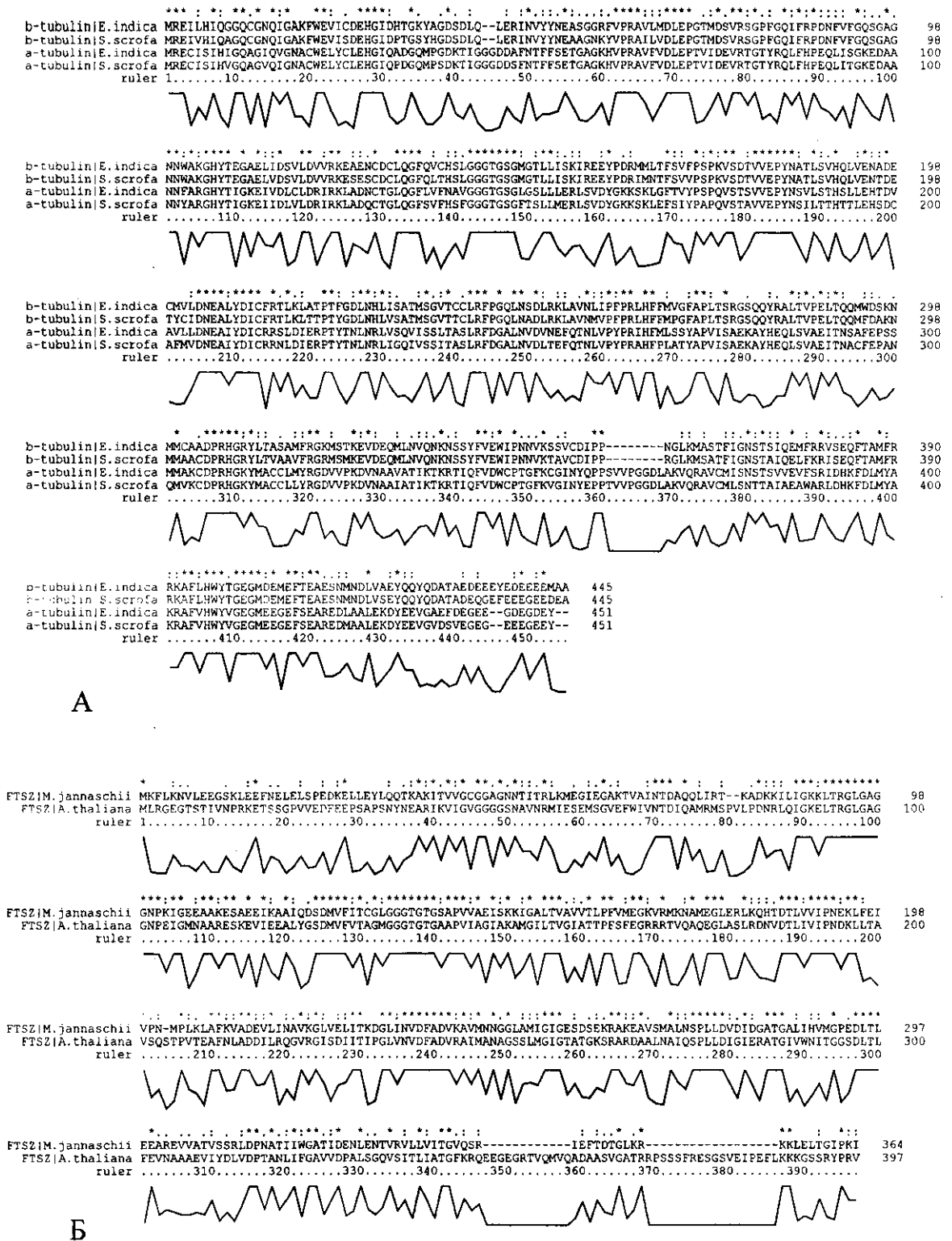
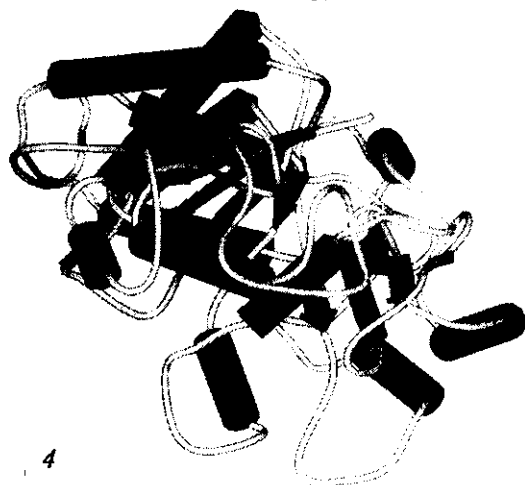
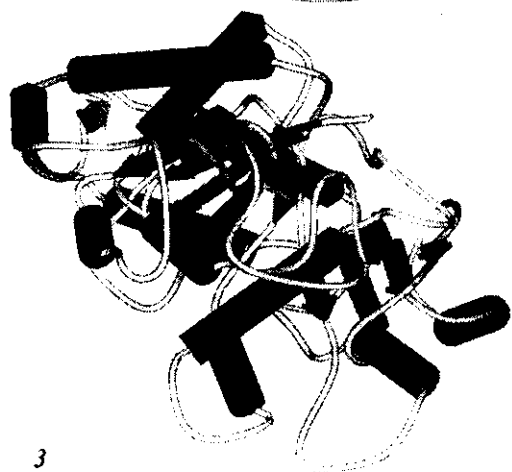
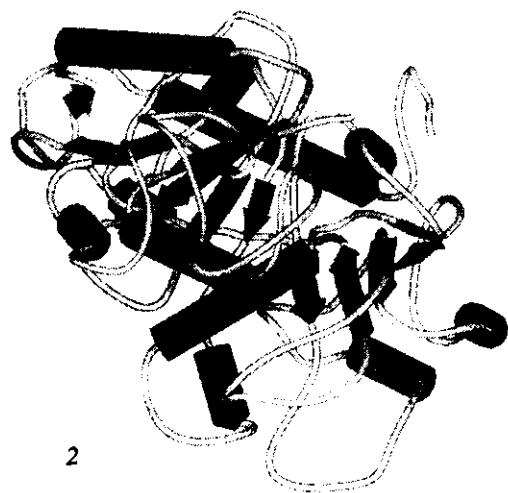


Рис. 1. Сравнительный анализ последовательностей внутри семейств тубулинов (A) и FtsZ (B)



СРАВНЕНИЕ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ТУБУЛИНОВ И FTSZ-БЕЛКОВ

Продолжение таблицы

№	α-тубулины				β-тубулины				FtsZ-белки			
	<i>E. indica</i>		<i>S. scrofa</i>		<i>E. indica</i>		<i>S. scrofa</i>		<i>M.jannarsinii</i>		<i>A.thaliana</i>	
	AK	стр(s)	стр(l)	AK	стр	AK	стр	AK	стр	AK	стр	
217	C			C	H6	C	H7	C	H6	V	V	
218	R			R	H6	R	H7	R	H6	N	S	
219	R			R	H6	R	H7	R	H6	N	O	
220	S			S	H6	S	H7	S	H6	N	T	
221	L	H8		L	H6	L	H7	L	H6	M	P	
222	D			D		D		D		P	L	
223	I			I		I		I		L	P	
224	E			E		E		E		L	T	
225	R			R		R		R		L	T	
226	P			P		P		P		L	T	
227	T			T		T		T		L	T	
228	Y			Y		Y		Y		L	T	
229	N			N		N		N		L	T	
230	L			L		L		L		L	T	
231	N			N		N		N		L	T	
232	R			R		R		R		L	T	
233	L			L		L		L		L	T	
234	R			R		R		R		L	T	
235	L			L		L		L		L	T	
236	S			S		S		S		L	T	
237	O			O		O		O		L	T	
238	V			V		V		V		L	T	
239	I			I		I		I		L	T	
240	S			S		S		S		L	T	
241	S			S		S		S		L	T	
242	L	H11		L	H7	L	H8	L	H7	K	G	
243	T	H11		T	H7	T	H8	T	H7	K	G	
244	A	H11		A	H7	A	H8	A	H7	K	G	
245	S	H11		S	H7	S	H8	S	H7	K	G	
246	L	H11		L	H7	L	H8	L	H7	K	G	
247	R	H11		R	H7	R	H8	R	H7	K	G	
248	F	H11		F	H7	F	H8	F	H7	K	G	
249	D	H11		D	H7	D	H8	D	H7	K	G	
250	G	H7	H11	G	H7	G	H7	G	H7	K	G	
251	A	H7	H11	A	H7	A	H7	A	H7	K	G	
252	L			L		L		L		K	G	
253	N			N		N		N		K	G	
254	V			V		V		V		K	G	
255	D	H10	H11	D	H7	D	H7	D	H7	K	G	
256	N			N		N		N		K	G	
257	E			E		E		E		K	G	
258	F			F		F		F		K	G	
259	O			O		O		O		K	G	
260	T			T		T		T		K	G	
261	N	H10	H11	N	H7	N	H7	N	H7	K	G	
262	L	H10	H11	L	H7	L	H7	L	H7	K	G	
263	L	H10	H11	L	H7	L	H7	L	H7	K	G	
264	V			V		V		V		K	G	
265	P			P		P		P		K	G	
266	Y			Y		Y		Y		K	G	
267	P			P		P		P		K	G	
268	R			R		R		R		K	G	
269	I			I		I		I		K	G	
270	H			H		H		H		K	G	
271	F	H8	H11	F	H7	F	H7	F	H7	K	G	
272	M	H8	H11	M	H7	M	H7	M	H7	K	G	
273	L	H8	H11	L	H7	L	H7	L	H7	K	G	
274	S	H8	H11	S	H7	S	H7	S	H7	K	G	
275	S	H8	H11	S	H7	S	H7	S	H7	K	G	
276	S	H8	H11	S	H7	S	H7	S	H7	K	G	
277	Y	H8	H11	Y	H7	Y	H7	Y	H7	K	G	
278	A	H8	H11	A	H7	A	H7	A	H7	K	G	
279	P	H8	H11	P	H7	P	H7	P	H7	K	G	
280	V	H8	H11	V	H7	V	H7	V	H7	K	G	
281	J	H8	H11	J	H7	J	H7	J	H7	K	G	
282	A	H8	H11	A	H7	A	H7	A	H7	K	G	
283	E	H8	H11	E	H7	E	H7	E	H7	K	G	
284	K	H8	H11	K	H7	K	H7	K	H7	K	G	
285	A	H8	H11	A	H7	A	H7	A	H7	K	G	
286	Y	H8	H11	Y	H7	Y	H7	Y	H7	K	G	
287	H	H8	H11	H	H7	H	H7	H	H7	K	G	
288	E	H8	H11	E	H7	E	H7	E	H7	K	G	
289	O	H8	H11	O	H7	O	H7	O	H7	K	G	
290	L	H8	H11	L	H7	L	H7	L	H7	K	G	
291	S	H8	H11	S	H7	S	H7	S	H7	K	G	
292	V	H8	H11	V	H7	V	H7	V	H7	K	G	
293	A	H8	H11	A	H7	A	H7	A	H7	K	G	
294	E	H8	H11	E	H7	E	H7	E	H7	K	G	
295	S	H8	H11	S	H7	S	H7	S	H7	K	G	
296	I	H8	H11	I	H7	I	H7	I	H7	K	G	
297	T	H8	H11	T	H7	T	H7	T	H7	K	G	
298	S	H8	H11	S	H7	S	H7	S	H7	K	G	
299	A	H8	H11	A	H7	A	H7	A	H7	K	G	
300	F	H8	H11	F	H7	F	H7	F	H7	K	G	
301	L	H8	H11	L	H7	L	H7	L	H7	K	G	
302	P	H8	H11	P	H7	P	H7	P	H7	K	G	
303	S	H8	H11	S	H7	S	H7	S	H7	K	G	
304	A	H8	H11	A	H7	A	H7	A	H7	K	G	
305	M	H8	H11	M	H7	M	H7	M	H7	K	G	
306	M	H8	H11	M	H7	M	H7	M	H7	K	G	
307	A	H8	H11	A	H7	A	H7	A	H7	K	G	
308	K	H8	H11	K	H7	K	H7	K	H7	K	G	

№	α-тубулины				β-тубулины				FtsZ-белки			
	<i>E. indica</i>		<i>S. scrofa</i>		<i>E. indica</i>		<i>S. scrofa</i>		<i>M.jannarsinii</i>		<i>A.thaliana</i>	
	AK	стр(s)	стр(l)	AK	стр	AK	стр	AK	стр	AK	стр	
325	G			G		G		G		D	D	
326	D			D		D		D		L	L	
327	V			V		V		V		T	T	
328	V			V		V		V		L	L	
329	P			P		P		P		L	L	
330	K			K		K		K		L	L	
331	D			D		D		D		L	L	
332	V			V		V		V		L	L	
333	N			N		N		N		L	L	
334	A			A		A		A		L	L	
335	A			A		A		A		L	L	
336	V			V		V		V		L	L	
337	A			A		A		A		L	L	
338	T			T		T		T		L	L	
339	I			I		I		I		L	L	
340	K			K		K		K		L	L	
341	T			T		T		T		L	L	
342	K			K		K		K		L	L	
343	R	H13	H14	R	H12	R	H12	R	H12	L	L	
344	T	H13	H14	T	H12	T	H12	T	H12	L	L	
345	I	H13	H14	I	H12	I	H12	I	H12	L	L	
346	O	H13	H14	O	H12	O	H12	O	H12	L	L	
347	F	H13	H14	F	H12	F	H12	F	H12	L	L	
348	S	H13	H14	S	H12	S	H12	S	H12	L	L	
349	W	H13	H14	W	H12	W	H12	W	H12	L	L	
350	D			D		D		D		L	L	
351	C			C		C		C		L	L	
352	P			P		P		P		L	L	
353	T			T		T		T		L	L	
354	G			G		G		G		L	L	
355	F	H10	H11	F	H10	F	H10	F	H10	L	L	
356	K	H10	H11	K	H10	K	H10	K	H10	L	L	
357	C	H10	H11	C	H10	C	H10	C	H10	L	L	
358	G	H10	H11	G	H10	G	H10	G	H10	L	L	
359	I	H10	H11	I	H10	I	H10	I	H10	L	L	
360	N	H10	H11	N	H10	N	H10	N	H10	L	L	
361	Y			Y		Y		Y		L	L	
362	O			O		O		O		L	L	
363	P			P		P		P		L	L	
364	P			P		P		P		L	L	
365	S			S		S		S		L	L	
366	V			V		V		V		L	L	
367	P			P		P		P		L	L	
368	P			P		P		P		L	L	
369	G	H13	H14	G	H13	G	H13	G	H13	L	L	
370	G	H13	H14	G	H13	G	H13	G	H13	L	L	
371	D	H13	H14	D	H13	D	H13	D	H13	L	L	
372	L			L		L		L		L	L	
373	A			A		A		A		L	L	
374	K			K		K		K		L	L	
375	V			V		V		V		L	L	
376	O			O		O		O		L	L	
377	R			R		R		R		L	L	
378	A			A		A		A		L	L	
379	V	H11	H12	V	H11	V	H11	V	H11	L	L	
380	C	H11	H12	C	H11	C	H11	C	H11	L	L	
381	M	H11	H12	M	H11	M	H11	M	H11	L	L	
382	I	H11	H12	I	H11	I	H11	I	H11	L	L	
383	S	H11	H12	S	H11	S	H11	S	H11	L	L	
384	N	H11	H12	N	H11	N	H11	N	H11	L	L	
385	S	H11	H12	S	H11	S	H11	S	H11	L	L	
386	T	H11	H12	T	H11	T	H11	T	H11	L	L	
387	S	H11	H12	S	H11	S	H11	S	H11	L	L	
388	V	H11	H12	V	H11	V	H11	V	H11	L	L	
389	V	H11	H12	V	H11	V	H11	V	H11	L	L	
390	E			E		E		E		L	L	
391	F			F		F		F		L	L	
392	V			V		V		V		L	L	
393	S			S		S		S		L	L	
394	R			R		R		R		L	L	
395	I			I		I		I		L	L	
396	D			D		D		D		L	L	
397	H			H		H		H		L	L	
398	K			K		K		K		L	L	
399	F			F		F		F		L	L	
400	D			D		D		D		L	L	
401	L			L		L		L		L		

Окончание таблицы

№	α-тубулины				β-тубулины				FtsZ-белки		
	<i>E. indica</i>		<i>S. scrofa</i>		<i>E. indica</i>		<i>S. scrofa</i>		<i>M.jannarshii</i>	<i>A.thaliana</i>	
	AK	стр(s)	стр(r)	AK	стр	AK	стр	AK	стр	AK	стр
433	E	-	-	E	-	V	-	V	-	P	-
434	K	-	-	D	-	A	-	K	-	R	-
435	D	-	-	V	-	E	-	I	-	R	-
436	Y	-	-	E	-	E	-	Y	-	V	-
437	E	-	-	O	-	O	-	O	-	O	-
438	E	-	-	O	-	O	-	O	-	O	-
439	V	-	-	G	-	O	-	O	-	O	-
440	G	-	-	V	-	D	-	O	-	O	-
441	A	-	-	-	O	-	D	-	A	-	
442	A	-	-	V	-	-	-	-			
443	F	-	-	-	-	-	-				
444	-	-	-	-	-	-					
445	-	-	-	-	-	-					
446	-	-	-	-	-	-	-				
447	-	-	-	-	-	-	-				
448	G	-	-	-	-	-	-				
449	E	-	-	-	-	-	-				
450	D	-	-	-	-	-	-				
451	D	-	-	-	-	-	-				
	D	-	-	-	-	-	-				
	D	-	-	-	-	-	-				
	D	-	-	-	-	-	-				
	D	-	-	-	-	-	-				
	D	-	-	-	-	-	-				
	D	-	-	-	-	-	-				
	D	-	-	-	-	-	-				
	D	-	-	-	-	-	-				
	D	-	-	-	-	-	-				
	D	-	-	-	-	-	-				
	D	-	-	-	-	-	-				
	D	-	-	-	-	-	-				

особенностью α-тубулина свиньи является наличие трех аминокислот (в позициях 110, 113 и 114), геометрия которых меняется в пределах от спиральной до складчатой. Можно также отметить, что для высококонсервативных аминокислотных остатков (см. выше) гомология вторичной структуры является нехарактерной.

Степень упорядоченности структуры для всех исследуемых белков колеблется в пределах 55—56 %, за исключением бактериального FtsZ, структурированность которого более высокая — 65 %. Но по степени вариабельности структуры молекул семейства тубулинов и семейства FtsZ четко различается между собой. Так, для первых она весьма высока и составляет 49 и 54 % для α-тубулинов *S. scrofa* и *E. indica*, 44 и 42 % — для соответствующих β-тубулинов. Интересно, что устойчивый биотип гусиной травы характеризуется несколько повышенным уровнем стабильности: его вариабельность составляет всего 40 %. Целый ряд структурных элементов тубулинов не имеет участков (ядер) с устойчивой структурой, в особенности это касается элементов складок. Нестабильными для всех тубулинов являются складки S3, S7, а также спиральные элементы в районах 302—304 (кроме устойчивого биотипа), 343—346. Для α-тубулинов характерна нестабильная складка S6 и спирали 369—371. β-Тубулин гусиной травы отличается наличием метастабильных складок S11 и S12, отсутствующих у других белков.

В отличие от вторичной структуры тубулинов вторичная структура FtsZ обладает значительной динамической устойчивостью, показатель вариа-

бельности составляет 21 % для бактериального и 25 % для растительного белков. Наличие безъядерных (полностью нестабильных) структурных элементов для этого семейства нехарактерно. Большая степень структурной стабильности FtsZ определяется более плотным характером упаковки белковой глобулы. Соотношение количества аминокислот к объему молекулы составляет 15,2 % против 12,7 % у тубулинов.

Вторичная структура α-тубулина устойчивого биотипа гусиной травы обладает рядом интересных особенностей. Замена единственной аминокислоты влияет на структуру не только непосредственно около места мутации, где в область спирализации вовлекаются еще шесть аминокислот в положениях 242—247, а также вызывает увеличение стабильного ядра на три остатка в положениях 239—241 (структура этой области больше напоминает аналогичную область животного α-тубулина). Наблюдаются также изменения в распределении структурных элементов на отдаленных участках аминокислотной последовательности этой молекулы, которые сопровождаются значительным повышением уровня стабильности структуры. Существенно увеличивается размер структурных ядер, а в элементах H18, S8, S11 они возникают *de novo*. «Эффект единичной замены» оказывается столь весомым ввиду консервативности Thr-239 для всех известных α-тубулинов, а также пространственной близости этой позиции к целому ряду структурно значимых участков.

На основе вышеизложенного можно сделать вывод о том, что при общем подобии структуры исследованных белков наблюдается целый ряд отличий, касающихся распределения компонентов вторичной структуры и их устойчивости во времени, которые, вероятно являются определяющими для ряда их индивидуальных фармакологических и иммунологических свойств. Динамическая метастабильность молекул тубулинов, очевидно, является одним из факторов, который наряду с гидролизной активностью β-тубулинов может обуславливать присущую микротрубочкам динамическую нестабильность в живой клетке.

A. Yu. Niporko, Ya. B. Blum

Comparative analysis of the tubulin secondary structure

Summary

The secondary structure of tubulin and FtsZ molecules from evolutionary distant organisms was analyzed. It was revealed that a majority of the secondary structure elements is common for all proteins investigated, but each protein has also unique structure elements. The time stability of molecules secondary structure is clearly different for the tubulin and FtsZ classes. In the case of

tubulin we can speak about dynamic metastability of the secondary structure specific for these proteins.

О. Ю. Нипорко, Я. Б. Блюм

Порівняльний аналіз вторинної структури тубулінів і FtsZ-білків

Резюме

Проаналізовано вторинну структуру молекул тубулінів та FtsZ-білків з еволюційно віддалених організмів. Виявлено, що більшість елементів вторинної структури є спільними для всіх досліджуваних білків, але при цьому кожен білок має також і унікальні структурні елементи. Стабільність вторинної структури молекул у часі чітко відрізняється для класу тубулінів і класу FtsZ. У випадку тубулінів можна говорити про властиву цим білкам динамічну метастабільність вторинної структури.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hyams J. S., Lloyd C. W. Microtubules.—New York: Wiley-Liss, 1993.
2. Fosket D. E., Morejhon L. C. Structural and functional organization of tubulin // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*—1992.—43.—P. 201—240.
3. Mandelkow E., Mandelkova E.-M. Microtubules and microtubule-associated proteins // *Curr. Opin. Cell Biol.*—1995.—7.—P. 72—81.
4. Vallee R. B., Sheetz M. P. Targeting of motor protein // *Science.*—1996.—271.—P. 1539—1544.
5. Nath J. P., Himes R. H. Localization of the exchangeable nucleotide binding domain in beta-tubuline // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1986.—135.—P. 1135—1143.
6. Carlier M.-F. Role of nucleotide hydrolysis in the polymerization of actin and tubulin // *Cell Biophys.*—1988.—12.—P. 105—117.
7. de Boer P. A. J., Cook W. R., Rothfield L. I. Bacterial cell division // *Annu. Rev. Genet.*—1990.—24.—P. 249—274.
8. Ericson H. P. FtsZ, a tubulin homologue in prokaryotic cell division // *Trends Cell Biol.*—1997.—7.—P. 362—367.
9. Rothfield L. I., Justice S. S. Bacterial cell division: the cycle of the ring // *Cell.*—1997.—88.—P. 581—584.
10. Kuroiwa T., Kuroiwa H., Sakai A. The division apparatus of plastids and mitochondria // *Int. Rev. Cytol.*—1998.—181.—P. 1—41.
11. Nogales E., Downing K. E., Amos L. A., Lowe J. Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases // *Nat. Struct. Biol.*—1998.—5.—P. 451—458.
12. Nogales E., Wolf S. G., Zhang S., Downing K. H. Preservation of 2-D crystals of tubulin for electron crystallography // *J. Struct. Biol.*—1995.—115.—P. 199—208.
13. Nogales E., Wolf S. G., Downing K. H. Structure of $\alpha\beta$ -tubulin dimer by electron crystallography // *Nature.*—1998.—391.—P. 199—203.
14. Lowe J., Amos L. A. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ // *Nature.*—1998.—391.—P. 203—206.
15. Damaschun G., Damaschun H., Gast K., Zirwer D. Protein can adopt totally different folded conformations // *J. Mol. Biol.*—1999.—291.—P. 715—725.
16. MacKerell A. D., Bashford D., Bellot M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamic studies of proteins // *J. Phys. Chem.*—1998.—102.—P. 3586—3616.
17. Koehl P., Levitt M. Theory and simulation: can theory challenge experiment? // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—1999.—9.—P. 155—156.
18. Alm E., Baker D. Mating theory and experiment in protein folding // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—1999.—9.—P. 189—196.
19. Емец А. И., Блюм Я. Б. Устойчивость растений к гербицидам с антимицротрубочковым механизмом действия: от природных мутантов до переноса генов // *Физиология растений.*—1999.—46.—С. 899—907.
20. Cronin K. E., Hussey P. J., Ray J. A., Waldin T. R. Herbicide resistant plants // *World Intellect. Property Org. Int. Publ.*—1993.—N WO 93/24637.
21. Yamamoto E., Zeng L., Baird W. V. α -tubulin missense mutation correlate with antimicrotubule drug resistance in *Eleusine indica* // *Plant Cell.*—1998.—10.—P. 297—308.
22. Bairoch A., Apweiler R. The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL in 2000 // *Nucl. Acids Res.*—2000.—28.—P. 45—48.
23. Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // *Nucl. Acids Res.*—1997.—24.—P. 4876—4882.
24. Guex N., Peitsch M. C. Molecular modelling of proteins // *Immunol. News.*—1999.—6.—P. 132—134.
25. HyperChem release 5.0. Reference manual.—Ottawa: Hypercube Inc., 1996.—656 p.
26. Van der Spoel D., van Buuren A. R., Apol E. GROMACS user manual, version 2.0 — BIOSON Res. Inst. and Lab. of Biophys. Chem. of Univ. of Groningen.—Groningen, 1999.
27. Kabsch W., Sander C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features // *Biopolymers.*—1983.—22.—P. 2577—2637.
28. Guex N., Peitsch M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb-Viewer: An environment for comparative protein modeling // *Electrophoresis.*—1997.—18.—P. 2714—2723.
29. Amos L. A. Focusing-in on microtubules // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—2000.—10.—P. 236—241.

УДК 577.322.4:57

Надійшла до редакції 05.07.2000