

Биоинформатический поиск потенциальных сайтов фосфорилирования мелузина – интегрин-1-связывающего белка

И. В. Крупская, Л. М. Капустян, Л. Л. Сидорик

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680

i.v.kroupskaya@imbg.org.ua

Фосфорилирование белков является важным механизмом посттрансляционной модификации и существенно влияет на клеточные процессы, такие как метаболизм, дифференциация, мембранный транспорт и сигнальные пути клетки. Мелузин – интегрин-1-связывающий белок – относится к белкам, остро реагирующим на пороговые уровни механического стресса и активирующим сигнальные пути кардиомиоцитов. В данной работе проведен поиск потенциальных сайтов фосфорилирования мелузина с использованием биоинформатического анализа первичной последовательности белка. С помощью объединенного биоинформатического подхода к предсказанию сайтов фосфорилирования, а также эволюционных и структурных исследований идентифицировано, что именно Ser₃₂₆, Ser₃₂₉, Ser₃₃₄ мелузина являются потенциальными участками для фосфорилирования протениназой CK2.

Ключевые слова: мелузин, С-концевой домен, сигнальные пути клетки, предсказание сайтов фосфорилирования, вторичная структура белков, 3D-структура.

Введение. Мелузин – цитоплазматический белок с уникальными структурными особенностями, синтезирующийся в скелетной и сердечной ткани. Известно, что мелузин человека (integrin-1-binding protein of 2-ITGB1BP2) относится к так называемым хордовым белкам [1]. Это мультидоменный белок, состоящий из 347 аминокислотных остатков, N-концевой участок которого представлен двумя цистеин/гистидин богатыми доменами (CHORD-domain), способными связывать ионы Zn²⁺ (рис. 1). С-концевой участок белка содержит так называемый CS-домен, который обнаружен также в -кристаллине, p23 и Sgt1 белках [2], принадлежащих к семейству молекулярных шаперонов, и является сайтом связывания с цитоплазматическим доменом 1-интегрин. «Хвостовая» часть

С-концевого домена богата глутаминовой и аспарагиновой аминокислотами и является областью связывания ионов Ca²⁺. Мелузин взаимодействует с цитоплазматическим доменом 1-интегрин и локализован в костамерах, участвуя, таким образом, в молекулярном механизме присоединения саркомера к сарколемме и внутриклеточному матриксу [1, 3]. Предполагают, что мелузин играет ключевую роль в гипертрофии сердца.

В экспериментах на мышцах по инактивации гена мелузина сделано предположение о том, что этот белок не является критичным в формировании эмбрионального сердца, саркомерной организации или функционировании сердца при нормальных условиях [2, 4]. Удаление мелузина нарушает гипертрофический ответ левого желудочка и драматически ускоряет переход к сердечному расширению – дилатации [3, 4]. Уменьшение силы взаимо-

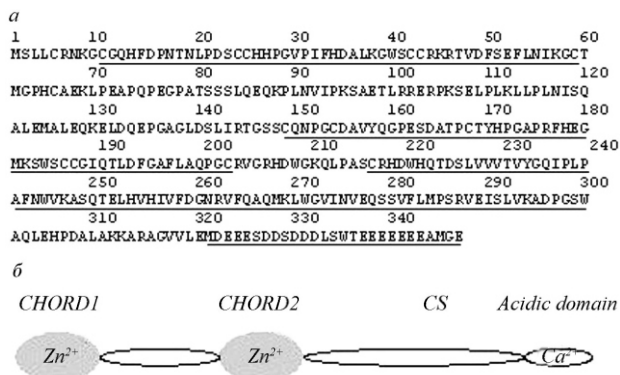


Рис. 1. Аминокислотная последовательность (а) и доменная организация мелузина человека (*Homo sapiens*) (б): CHORD1 – 5–59; CHORD2 – 148–201; CS – 215–304; acidic domain – Ca²⁺-связывающий домен 320–346

действия мелузина с цитоплазматическим доменом 1-интегрина и ИЛК киназой в костамерных соединениях вызывает сердечную дисфункцию и развитие дилатационной кардиомиопатии (ДКМ) [5]. В то же время при суперэкспрессии мелузина у трансгенных мышей желудочки их сердец сохраняли полную сократительную функцию в период, когда сердца подвергали длительной и постоянной перегрузке [6]. Такие функциональные свойства сопровождались защитой от апоптоза и недостатка стромального смещения ткани. Мелузин контролирует гипертрофическую реакцию сердца в ответ на различные стрессы, такие, например, как повышенное давление. Механические изменения в кардиомиоцитах активируют несколько сигнальных путей клетки: MAPK, JAK/STAT, PI3K/AKT, AKT/GSK3 [6–8]. Мелузин принадлежит к белкам, остро реагирующим на пороговые уровни механического стресса, и активирует AKT/GSK3 -сигнальные пути, контролирующие гипертрофию кардиомиоцитов; он является молекулой с уникальной способностью вызывать компенсаторную гипертрофию и предотвращать сердечную дилатацию, а также сердечную недостаточность [6]. Изучение роли мелузина в сигнальных путях кардиомиоцитов очень актуально и представляет большой теоретический и практический интерес.

Наши исследования посвящены поиску потенциальных сайтов фосфорилирования мелузина с использованием биоинформатического анализа структуры белка. Предсказание базируется на ана-

лизе доступности сайтов на линейной молекуле по уровню гидрофобности исходя из предположения о том, что гидрофобные последовательности будут скорее спрятаны в середину молекулы белка, чем экспонированы наружу. В результате проведенного анализа обнаружено, что потенциальными участками для фосфорилирования протеинкиназой СК2 являются Ser₃₂₆, Ser₃₂₉ и Ser₃₃₄.

Материалы и методы. *Филогенетический анализ.* Сравнение первичной последовательности белка проводили с применением программы CLUSTAL W [9]. Белковые последовательности мелузина человека 1 и 2 получены из базы данных NCBI и SwissProt и использованы для поиска соответствующих белков из других представителей эукариотов помощью BLAST 2.0 на BLAST NCBI.

Поиск сайтов фосфорилирования. Поиск потенциальных участков фосфорилирования осуществляли с помощью следующих программ online ресурсов: ScanSite [10], NetPhos 2.0 [11], KinasePhos 2.0 [12]. Эти программы, основанные на первичной последовательности белков, дают возможность предсказывать целые мотивы для различных известных протеинкиназ с использованием селективной матрицы, рассчитанной в результате скрининга белковых библиотек, а также базируются на анализе доступности сайтов на молекуле белка.

Предсказание вторичной структуры белка. Вторичную структуру белка предсказывали с применением программы GORNIER4 [13] и веб-сервера программы PHD [14].

Построение 3D-структуры белка. 3D-Структура мелузина смоделирована на основе структуры CHORD-содержащего белка-1 (CHORD containing protein-1 (2YRT)) [15] с помощью веб-сервера программы 3D-JIGSAW (version 2.0) www.bmm.icnet.uk [16, 17]. По 3D-структуре определяли экспонированность соответствующих аминокислот программой «SWISS PDB Viewer».

Результаты и обсуждение. Нами проведен компьютерный анализ структуры мелузина человека для выявления потенциальных сайтов фосфорилирования. Особое внимание уделено Ser/Thr протеинкиназам, участвующим в PI3K-AKT, AKT/GSK3 и других сигнальных путях, активиру-

Сводная таблица предсказания сайтов фосфорилирования мелузина

Источник белка	NetPhos 2.0	ScanSite	Kinase Phose 2.0
<i>Homo sapiens</i> , isoform 2	S23 S96 S107 S326 S329 S334	S326 S329 S334 T336	S83 S163 S326 S329 S334 T336
<i>Homo sapiens</i> , inisoform1	S65 S89 S308 S311 S316	S308 S311 S316 T318	S65 S145 S308 S311 S316 T318
<i>Bos taurus</i> , isoform 1	S23 S83 S96 S107 S283 S327 S330 S335	S32 S330 S335 T337	S83 S327 S330 S335 T337
<i>Macaca mulatta</i> , isoform 1	S65 S89 S265 S309 S312 S317	S309 S312 S317 T319	S65 S146 S309 S312 S317 T319
<i>Macaca mulatta</i> , isoform 2	S83 S249 S283 S326 S329 S334	S327 S330 S335 T337	S83 S164 S327 S330 S335 T337
<i>Mus musculus</i>	S23 S96 S283 S327 S330 S335	S327 S330 S335 T337	S83 S164 S309 S327 S330 S335 T337
<i>Canis familiaris</i>	S83 S107 S283 S327 S330 S335	S327 S S330 S335 T337	S90 S171 S334 S337 S342 T344
<i>Pan troglodytes</i> , isoform 1	S65 S78 S89 S308 S311 S318	S308 S311 S316 T318	S65 S145 S308 S311 S316 T318
<i>Pan troglodytes</i> , isoform 2	S23 S8 S3S96 S107 2S326 S329 S334	S326 S32 S3349 T336	S83 S163 S326 S329 S334 T336
<i>Rattus norvegicus</i>	S106 S282 S326S329 S334	S326 S32 S3349 T336	S83 S163 S308 S326 S329 S334 T336
<i>Sus scrofa</i>	S23 S83 S96 S107 S162 S283 S316 S327 S330 S335	S327 S330 S335	S164 S249 S327 S330 S335 T337

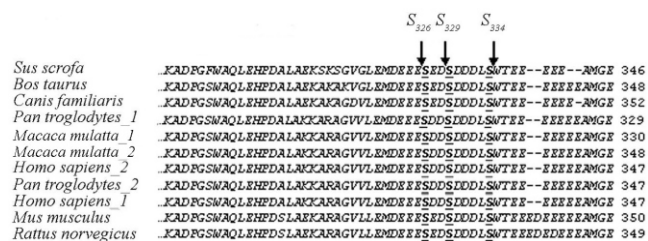


Рис. 2. Множественное выравнивание последних С-концевых аминокислотных остатков мелузина разного происхождения. Стрелками указана локализация Ser (S)

ющихся при различных видах стресса и влекущих за собой механические изменения в кардиомиоцитах. Программой NetPhos 2.0 обнаружены семь сайтов фосфорилирования мелузина по серину и один – по треонину. Мы отбирали те сайты фосфорилирования, вероятность предсказания которых составляла 0,8 и выше, а также которые совпадали с предсказанными сайтами фосфорилирования другими программами: ScanSite и KinasePhase 2.0 (таблица). В результате сравнительного анализа отобранные S_{326} , S_{329} и S_{334} являющиеся наиболее вероятными сайтами фосфорилирования для протеинкиназы СК2. Чтобы выяснить, насколько консервативны эти аминокислоты, нами проведены поиск и сравнение известных на сегодня последовательностей мелузина эукариотов, а именно:

Q9UKP_Homo sapiens_1,
Q5449J7_Homo sapiens,
Q32N04_ITBP2_Homo sapiens_2,
Q462R2_ITBP2_Sus scrofa,
Q9R000_INBP2_Mus musculus,
Q29RL2_Bovine,
DQ002920_Sus scrofa,
XM_590441_Bos taurus,
XM_001137370_Pan troglodytes_1,
XM_521119_Pan troglodytes_2,
XM_001069915_Rattus norvegicus,
XM_001091553_Macaca mulatta_1,
XM_001091670_Macaca mulatta_2,
XM_853326_Canis familiaris.

Обнаружено, что три указанных сайта – S_{326} , S_{329} и S_{334} – являются консервативными для мелузинов всех исследуемых представителей эукариотов (рис. 2). Как видно из этого рисунка, сами сайты фосфорилирования и аминокислотные остатки, окружающие его, не изменились в процессе эволюции, что свидетельствует о важности фосфорилирования этих аминокислот.

Для эффективного фосфорилирования аминокислота должны быть доступной протеинкиназам, т. е. располагаться на поверхности белка. Чтобы это выяснить, нами построены модели вторичных

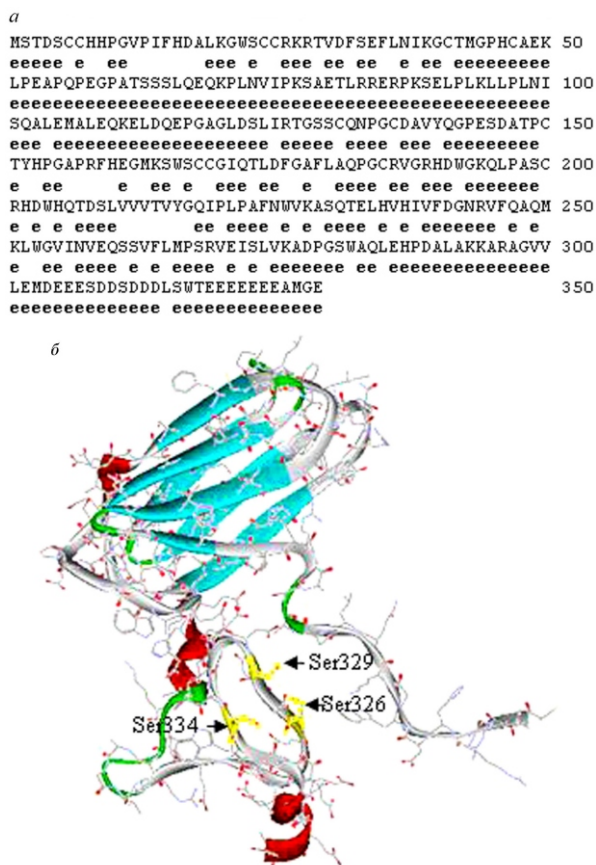


Рис. 3. Предсказание элементов вторичной структуры белка мелузина человека (e – экспонированные участки) (a) и предсказанная 3D-структура белка мелузина (б)

структур и проведено 3D-моделирование для мелузина человека (рис. 3), а также 12 остальных известных белков. Анализ предсказанных вторичных структур всех исследованных белков и соответственных трехмерных структур свидетельствует о том, что все предсказанные аминокислоты расположены на поверхности белковой молекулы. Это является важным подтверждением того, что именно S_{326} , S_{329} и S_{334} служат потенциальными сайтами фосфорилирования для протеинкиназы СК2, характеризующейся высокой активностью в сердце [18].

Белковое фосфорилирование, являющееся важным механизмом посттрансляционной модификации, существенно влияет на клеточные процессы, такие как метаболизм, дифференциация, мембранный транспорт и сигнальные пути клетки [19].

Известно, что С-домен мелузина по своей структуре подобен С-домену кальцеквестрина [20], который в свою очередь содержит сайты фосфори-

лирования для протеинкиназы СК2 [21] и, так же как мелузин, связывает ионы Ca^{2+} . Взаимодействие мелузина и цитоплазматического домена 1-интегрина регулируется присутствием или отсутствием ионов Ca^{2+} , а ослабление взаимодействия мелузина, цитоплазматического домена 1-интегрина и ИЛК в костамере приводит к дисфункции и дилатации сердечной мышцы [5]. Известно, что мелузин участвует в Ca^{2+} -гомеостазе [22], а именно – в снижении концентрации ионов Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме кардиомиоцитов. Это способствует неправильной укладке белка в ответ стресс, вызывающий апоптоз у кардиомиоцитов и, как следствие, сердечную недостаточность. Исходя из вышеизложенного можно предположить, что именно фосфорилированные формы мелузина способны выполнять функцию, подобную кальцеквестрину, т. е. связывать неправильно уложенные белки и переносить их через эндоплазматический ретикулум в аппарат Гольджи и обеспечивать сложный клеточный транспорт, участвуя таким образом в сигнальных путях клетки. Вместе с тем наличие CS-домена и С-«хвостового» участка у мелузина является еще и сигнатурой для связывания S100 белков, причастных к Ca-регуляторной функции клетки [2, 23]. Возможно, что фосфорилирование мелузина приводит к посттрансляционной модификации белка, благодаря которой он связывает S100 белки.

I. V. Kroupskaya, L. M. Kapustian, L. L. Sidorik

Bioinformatic search for potential phosphorylation sites of melusin – integrin 1-binding protein

Summary

Phosphorylation is one of the most frequently occurring posttranslational modifications in proteins. It plays an essential role in transferring outside signals into a cell and regulates different cellular processes such as growth, metabolism, proliferation, motility and differentiation. Melusin is a stress response protein which strictly reacts to the threshold levels of mechanic stress and activates cardiomyocytes signaling pathways. The search for potential sites of melusin phosphorylation was performed using bioinformatic analysis of primary protein sequences. The comparative bioinformatic analysis of possible phosphorylation sites, evolutionary and structural motifs has identified Ser₃₂₆, Ser₃₂₉ and Ser₃₃₄ as the most likely sites for phosphorylation of melusin by protein kinase CK2 in cardiomyocytes.

Keywords: melusin, C-domain, secondary structure, 3D-structure, cell signaling pathways, prediction phosphorylation sites.

І. В. Крупська, Л. М. Капустян, Л. Л. Сидорик

Біоінформатичний пошук потенційних сайтів фосфорилування мелузину – інтегрин-1-зв'язувального білка

Резюме

Фосфорилування білків є важливим механізмом посттрансляційної модифікації, що суттєво впливає на клітинні процеси, такі як метаболізм, диференціація, мембранний транспорт та сигнальні шляхи клітини. Мелузин належить до білків, які гостро реагують на порогові рівні механічного стресу та активують сигнальні шляхи кардіоміоцитів. Наші дослідження присвячені пошуку потенційних сайтів фосфорилування мелузину з використанням біоінформаційного аналізу послідовності білка. Внаслідок об'єднаного біоінформатичного підходу передбачення сайтів фосфорилування, еволюційних і структурних досліджень ідентифіковано, що Ser₃₂₆, Ser₃₂₉ і Ser₃₃₄ мелузину є потенційними ділянками для фосфорилування протеїнкіназою CK2.

Ключові слова: мелузин, C- домен, сигнальні шляхи клітин, передбачення сайтів фосфорилування, вторинна структура білків, 3D-структура.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Brancaccio M., Guazzone S., Menini N., Sibona E., Hirsch E., De Andrea M., Rocchi M., Altruda F., Tarone G., Silengo L. Melusin is a new muscle specific interactor for beta(1) integrin cytoplasmic domain // J. Biol. Chem.–1999.–**274**.–P. 29282–29288.
2. Michowski W., Lee Y-T., Chazin W. J., Kuznicki J. Melusin binds calyculin (S100A6) protein in a Ca²⁺-dependent fashion // Eur. J. Biochem.–2003.–**1**, Suppl.–P. 3.7–09.
3. Brancaccio M., Fratta L., Notte A., Hirsch E., Poulet R., Guazzone S., De Acetis M., Vecchione C., Marino G., Altruda F., Silengo L., Tarone G., Lembo G. Melusin, a muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload // Nat. Med.–2003.–**9**, N 1.–P. 68–75.
4. Brancaccio M., Hirsch E., Notte A., Selvetella G., Lembo G., Tarone G. Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy // Cardiovasc. Res.–2006.–**70**, N 3.–P. 422–433.
5. Hannigan G. E., Coles J. C., Dedhar S. Integrin-linked kinase at the heart of cardiac contractility, repair and disease // Circ. Res.–2007.–**100**.–P. 1408–1414.
6. De Acetis M., Notte A., Accornero F., Selvetella G., Brancaccio M., Vecchione C., Sbroglio M., Collino F., Pacchioni B., Lanfranchi G., Aretini A., Ferretti R., Maffei A., Altruda F., Silengo L., Tarone G., Lembo G. Cardiac overexpression of melusin protects from dilated cardiomyopathy due to long-standing pressure overload // Circ. Res.–2005.–**96**, N 10.–P. 1087–1094.
7. Pan J., Fukuda K., Kodama H., Sano M., Takahashi T., Maki-no S., Kato T., Manabe T., Hori S., Ogawa S. Involvement of gp130-mediated signaling in pressure overload-induced activation of the JAK/STAT pathway in rodent heart // Heart Vessels.–1998.–**13**, N 4.–P. 199–208.
8. Seko Y., Takahashi N., Sabe H., Tobe K., Kadowaki T., Nagai R. Hypoxia induces activation and subcellular translocation of focal adhesion kinase (p125(FAK)) in cultured rat cardiac

- myocytes // Biochem. and Biophys. Res. Commun.–1999.–**262**, N 1.–P. 290–296.
9. Thomson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucl. Acids Res.–1994.–**22**.–P.4673–4680.
10. Obenauer J. C., Cantley L. C., Yaffe M. B. ScanSite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signalling interactions using short sequence motif // Nucl. Acids Res.–2003.–**31**.–P. 3635–3641.
11. Blom N., Gammeltoft S., Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites // J. Mol. Biol.–1999.–**294**.–P. 1351–1362.
12. Huang H. D., Lee T. Y., Tseng S. W., Horng J. T. Kinase Phos 2.0: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites // Nucl. Acids Res.–2005.–**33**.–P. W226–229.
13. Garnier J., Gibrat J.-F., Robson B. GOR secondary structure prediction method version IV // Meth. Enzymol.–1996.–**266**.–P. 540–553.
14. Rost B., Sander C., Schneider R. PHD – an automatic mail server for protein secondary structure prediction // Comput. Appl. Biosci.–1994.–**10**.–P. 53–60.
15. Nameki N., Saito K., Koshiha S., Kigawa T., Yokoyama S. Solution structure of the CHORD domain of human CHORD-containing protein 1 // RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative (RSGI) Release, 2008-04-08.
16. Offman M. N., Fitzjohn P. W., Bates P. A. Developing a move-set for protein model refinement // Bioinformatics.–2006.–**22**, N 15.–P. 1838–1845.
17. Guex N., Peitsch M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling // Electrophoresis.–1997.–**18**.–P. 2714–2723.
18. Kim S. O., Hasham M. I., Katz S., Pelech S. L. Insulin-regulated protein kinases during postnatal development of rat heart // J. Cell Biochem.–1998.–**71**, N 3.–P. 328–339.
19. Kuznetsov M., Janakiraman R., Troppmair M. J. Regulating cell survival by controlling cellular energy production: novel functions for ancient signaling pathways? // FEBS Lett.–2004.–**577**, N 1–2.0.–P. 1–4.
20. Scott B. T., Simmerman H. K., Collins J. H., Nadal-Ginard B., Jones L. R. Complete amino acid sequence of canine cardiac calyculin deduced by cDNA cloning // J. Biol. Chem.–1988.–**263**, N 18.–P. 8958–8964.
21. Cala S. E., Jones L. R. Phosphorylation of cardiac and skeletal muscle calyculin isoforms by Casein Kinase II // J. Biol. Chem.–1991.–**266**, N 1.–P. 391–398.
22. Gorza L., del Monte F. Protein unfolding in cardiomyopathies // Heart Fail Clin.–2005.–**1**, N 2.–P. 237–250.
23. Nowotny M., Spiechowicz M., Jastrzebska B., Filippek A., Kitagawa K., Kuznicki J. Calcium-regulated interaction of Sgt1 with S100A6 (calyculin) and other S100 proteins // J. Biol. Chem.–2003.–**278**, N 29.–P. 26923–26928.

УДК 577.21

Надійшла до редакції 21.04.08