Министерство образования и науки Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
(ФГБОУ ВПО СПбГУ)

Кафедра Биохимии

На правах рукописи

Рогачева Ольга Николаевна

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМА АКТИВАЦИИ ПРОТЕИНКИНАЗЫ А Iα

03.01.04 («Биохимия»)

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
В. Е. Стефанов

Научный консультант:
кандидат химических наук
Б. Ф. Щеголев

Санкт-Петербург 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ 2
ВВЕДЕНИЕ 6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 11
1.1 Протеинкиназа А. Общие сведения 11
1.2. Доменная структура RIα субъединицы 12
1.3. цАМФ-связывающие домены 14
1.3.1. Строение цАМФ-связывающих доменов 14
1.3.2 Модели конформационного перехода цАМФ-связывающих доменов 17
1.3.3. Лиганды цАМФ-связывающих доменов 19
1.4. Диссоциация RIα:C комплекса при цАМФ-индуцированной активации ПКА Iα 21
1.5. Заселенность конформаций отдельных цАМФ-связывающих доменов и R-субъединицы 24
1.6. Константы, характеризующие активацию ПКА Iα 26
1.6.1. Значения констант, характеризующих активацию ПКА Iα 26
1.6.2. Обсуждение приведенных значений констант, характеризующих активацию ПКА Iα 30
1.6.2.1. Константы диссоциации RC комплекса на свободные R- и C-субъединицы 30
1.6.2.2. Константы диссоциации цАМФ из цАМФ-связывающих сайтов R-субъединицы 32
1.6.2.3. Константы активации RC комплекса 34
1.7. Связь настоящего исследования с литературными данными 34
2. МЕТОДЫ 36
2.1. Докинг лигандов в цАМФ-связывающие сайты A- и B-домена RIα 36
2.2. Квантово-химический анализ параметров водородных связей, образуемых экваториальным атомом кислорода (серы) лиганда и амидной группой белка 36
2.3. Изучение конформационных переходов β-субдомена A-домена RIα, равновесия между его конформациями и влияния на это равновесие мутационных замен R209 37
2.3.1. Подготовка β-субдомена 38
2.3.2. Моделирование конформационного равновесия β-субдомена 38
2.3.3. Математическая обработка результатов методом кластерного анализа 40
2.4. Изучение H→B конформационного перехода A-домена ПКА Iα 42
2.4.1. Подготовка A-домена 42
2.4.2. Моделирование H→B конформационного перехода A-домена ПКА Iα методами молекулярной динамики 43

2.4.2.1 Методика моделирования H→B конформационного перехода A-домена RIα..... 43
2.4.2.2. Метод ускоренной молекулярной динамики (уМД)..... 44
2.4.3. Математическая обработка результатов методами факторного и кросскорреляционного анализов..... 47
2.5. Дополнительные программы и методики, применяемые при постановке моделирований и анализе их результатов 50
2.5.1. Выравнивание пространственных структур цАМФ-связывающих доменов и расчет RMSD между ними..... 50
2.5.2. Измерение углов между спиралями 51
2.5.3. Визуализация третичных структур..... 51
3. АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИГАНДОВ СО СВЯЗЫВАЮЩИМИ САЙТАМИ A- И B-ДОМЕНОВ ПКА Iα..... 52
3.1 Докинг цАМФ в цАМФ-связывающие сайты A- и B-доменов ПКА..... 52
3.2. Докинг Sp-цАМФS в цАМФ-связывающий сайт B-домена ПКА..... 54
3.3. Докинг Rp-цАМФS в цАМФ-связывающий сайт B-домена ПКА Iα..... 55
3.4. Квантово-химический анализ параметров водородных связей, образуемых экваториальным атомом кислорода (серы) лиганда и амидной группой белка..... 56
3.5 Обсуждение результатов 57
3.5.1. цАМФ-связывающий сайт A-домена R-субъединицы, находящейся в составе RC комплекса, может связывать цАМФ 57
3.5.2. Rp-цАМФS и Sp-цАМФS могут образовывать стабильные комплексы как со свободной R-субъединицей, так и с R-субъединицей, входящей в состав RC комплекса 58
3.5.3. Смещение амидной группы A202(A326) может запускать конформационный переход цАМФ-связывающих доменов..... 59
3.5.4 Численная оценка значений констант, характеризующих процесс активации ПКА Iα 59
3.6. Промежуточные выводы 62
4. МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИГАНДОВ с цАМФ-СВЯЗЫВАЮЩИМ САЙТОМ цАМФ-СВЯЗЫВАЮЩИХ ДОМЕНОВ ПКА Iα 63
4.1. Взаимодействие цАМФ с цАМФ-связывающим сайтом A-домена ПКА Iα 63
4.2. Взаимодействие Rp-цAMPS с цAMP-связывающим сайтом B-домена ПКА Iα 66
4.3. Обсуждение результатов 68
4.3.1. Переход A-домена ПКА Iα в B-конформацию запускается смещением амидной группы A202 68
4.3.2. Экспериментальные подтверждения предложенной модели обратного агонизма Rp-цАМФS..... 70

4.4. Промежуточные выводы 72
5. АМИНОКИСЛОТНЫЙ ОСТАТОК В ПОЛОЖЕНИИ 209 КАК ФАКТОР СТАБИЛИЗАЦИИ B-КОНФОРМАЦИИ А-ДОМЕНА ПКА Iα 73
5.1. Описание конформаций, принимаемых β-субдоменом А-домена ПКА Iα 73
5.2. Заселенность конформаций β-субдомена А-домена ПКА Iα 75
5.2.1. β-субдомен белка дикого типа в комплексе с цАМФ и не связанный с лигандом 75
5.2.2 β-субдомен с точечной заменой R209I в комплексе с цАМФ 79
5.2.3. β-субдомен с точечной заменой R209E, не связанный с лигандом 80
5.2.4. β-субдомен с точечной заменой R209G, не связанный с лигандом 81
5.2.5. β-субдомен с точечной заменой R209K, не связанный с лигандом 82
5.2.6. β-субдомен с точечной заменой R209K в комплексе с цАМФ 83
5.3. Обсуждение результатов 87
5.3.1. Вопрос применимости данных, полученных на β-субдомене к целому цАМФ-связывающему домену 87
5.3.2. Роль аминокислотного остатка в положении 209 в функционировании цАМФ-связывающего А-домена ПКА Iα 89
5.3.3. Электростатический «переключатель» R209–D170–R226 как механизм стабилизации конечных конформаций А-домена ПКА Iα, а не реализации конформационного перехода между ними 93
5.4. Промежуточные выводы 95
6. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕХАНИЗМА ПЕРЕХОДА А-ДОМЕНА R-СУБЪЕДИНИЦЫ ПКА Iα ИЗ H- В B-КОНФОРМАЦИЮ. РОЛЬ ГИДРОФОБНОГО И ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО «ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЕЙ» В ИЗМЕНЕНИИ КОНФОРМАЦИИ цАМФ-СВЯЗЫВАЮЩИХ ДОМЕНОВ 97
6.1. Оценка результатов моделирования H→B конформационного перехода для А-доменов дикого типа и с мутационной заменой R209K 98
6.2. Общая характеристика стадий и событий перехода А-домена из H- в B-конформацию 99
6.3. Описание событий конформационного перехода А-домена из H- в B-конформацию 103
6.3.1. События, в основе которых лежит конформационное изменение ФСК 103
6.3.2. События, в основе которых лежит конформационное изменение N3A-мотива 105
6.3.3. События, в основе которых лежит конформационное изменение B/C-спирали 106
6.4. Описание первого приближения к пути минимальной свободной энергии (ПМСЭ) перехода А-домена из H- в B-конформацию 111
6.5. Обсуждение результатов 113

6.5.1 Связь изложенных результатов с существующими экспериментальными и расчетными данными 113
6.5.2. Применимость полученных результатов к другим цАМФ-связывающим доменам 116
6.6. Промежуточные выводы 124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 126
ВЫВОДЫ 130
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 133
ПРИЛОЖЕНИЕ А 142
ПРИЛОЖЕНИЕ Б 149
Б.1 R_AC комплекс 149
Б.1.1. Схема процессов и постановка задачи 149
Б.1.2 Определение равновесных констант Kd_1, Kd_2, Kd_3 и Kd_4 150
Б.1.3. Уравнение Михаэлиса-Ментен 150
Б.1.4. Определение концентраций [CS] и [C] в системе 151
Б.1.5. Установление соотношения между концентрациями отдельных компонентов системы 151
Б.1.6. Определение концентрации цАМФ ([cAMP]) 152
Б.1.7. Определение концентраций [R], [RcAMP], [RC] и [RCcAMP] 153
Б.1.8. Возможные варианты строения комплекса RCcAMP и физический смысл констант Kd_1 и Kd_2 153
Б.1.9. Количественная оценка констант Kd1, Kd2, Kd3 и Kd4 157
Б.1.9.1. Комплекс R_AC WT 157
Б.1.9.2. Комплекс R_AC M234A 158
Б.1.9.3. Комплекс $R_{AB}C$ R333K 160
Б.1.9.4. Комплекс $R_{AB}C$ R209K 162
Б.2. $R_{AB}C$ комплекс 163
Б.2.1. Схема процессов и постановка задачи 163
Б.2.2 Вывод соотношений для оценки равновесных констант 166
Б.2.3. Определение концентрации компонентов системы 167
Б.2.4. Количественная оценка равновесных констант и $K_{акт}$ 167
ПРИЛОЖЕНИЕ В 171

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Протеинкиназа А (ПКА) – ключевой белок множества сигнальных каскадов. Известно его участие в дифференцировке клеток, развитии иммунного ответа, контроле путей метаболизма и многих других процессах [1, 2]. Ферментативную активность ПКА обеспечивают ее каталитические субъединицы (С-субъединицы), а неактивное состояние С-субъединиц достигается путем образования комплексов с рядом пептидов и белков. Наиболее изученными и, видимо, наиболее распространенными являются RC комплексы – комплексы С-субъединиц с белками, известными как регуляторные субъединицы ПКА (R-субъединицы). RC комплекс, образованный с участием RIα изоформы R-субъединицы, носит название ПКА Iα [1 – 3].

Важное свойство всех RC комплексов состоит в том, что они диссоциируют в присутствии внутриклеточного мессенджера, циклического аденозин-3':5'-монофосфата (цАМФ), на свободные R- и С-субъединицы, что приводит к активации ПКА [3]. Причина цАМФ-зависимой диссоциации RC комплексов заключается в том, что в состав всех изоформ R-субъединиц входят два цАМФ-связывающих домена (А-домен и В-домен), каждый из которых может существовать в двух конечных конформациях: цАМФ-связанной В-конформации и реализующейся в составе RC комплекса Н-конформации [4 – 6]. При связывании цАМФ оба домена претерпевают переход из Н- в В-конформацию, благодаря чему контакты между R- и С-субъединицами ослабевают [4, 5]. Понимание механизма конформационных изменений цАМФ-связывающих доменов, важно для решения ряда биологических задач.

Так, циклические нуклеотиды играют ключевую роль в терапии различных заболеваний. Известно, что аналог цАМФ, Rp-цАМФS, и его производные являются эффективными ингибиторами ПКА Iα [7], а следовательно, могут использоваться для лечения патологических состояний, при которых путь цАМФ/ПКА Iα гиперакитивирован. Одним из примеров таких состояний являются ВИЧ-инфекции. В данном случае гиперактивация ПКА Iα приводит к угнетению Т-клеточного ответа, а введение Rp-цАМФS и его производных восстанавливает пролиферацию Т-клеток [8]. Понимание процесса цАМФ-индуцированной активации ПКА Iα могло бы не только ускорить получение клинического препарата, но и позволило бы сделать его максимально эффективным.

Кроме того, известно, что RIα субъединица, помимо поддержания неактивного состояния ПКА, участвует в инактивации цитохромоксидазы [9], образует комплексы с mTOR киназой [10], рибосомальной S6 киназой 1 (RSK1) [11] и Smad3/Smad4 комплексом [12], контролирует транспорт факторов транскрипции (PATZ1) [13] и репликации (RFC40) [14] в ядро, причем некоторые из этих процессов регулируются цАМФ. Установление механизма конформационных переходов R-субъединицы лежит в основе описания структуры и объяснения

функционирования этих белковых комплексов, а также прогнозирования взаимодействия R-субъединицы с другими белками.

Наконец, цАМФ-связывающие и родственные им домены широко представлены в протеомах разнообразных организмов. Они входят в состав транскрипционных факторов прокариот (в том числе активируемых и не циклическими нуклеотидами) [15 – 18], HCN каналов (собственно HCN [19] и spIH [20]), CNG каналов [21], белков EPAC [22, 23], протеин-киназ А [24] и Г [25, 26]. Описание конформационного перехода любого из этих доменов существенно для понимания функционирования всех названных белков, а также для решения практических задач, связанных с регуляцией их активности.

Объектом исследования является цАМФ-связывающий А-домен ПКА Iα.

Предметом исследования является механизм перехода этого домена из H- в B-конформацию.

Степень разработанности проблемы. На сегодняшний день расшифрованы кристаллические структуры цАМФ- [6] и Rp-цАМФS-связанных [27] R-субъединиц (в том числе и отдельного цАМФ- и Rp-цАМФS-связанного А-домена RIα [5]), свободного А-домена RIα и каталитически неактивного комплекса R- и C-субъединиц [4, 28, 29]. Методом ЯМР продемонстрировано, что изолированные цАМФ-связывающие домены в отсутствие внешних факторов находятся в состоянии динамического равновесия между H- и B-конформациями [30, 31]. Способность ряда белков и низкомолекулярных соединений (в том числе цАМФ) влиять на положение искомого равновесия и скорость его достижения лежит в основе выполнения всех биологических функций цАМФ-связывающих доменов.

Для объяснения механизма перехода этих доменов (и в частности А-домена RIα) из одной конформации в другую были предложены модели двух «переключателей»: электростатического (R209–D170–R226) [5, 32] и гидрофобного (L203–Y229) [30, 33]. Модель гидрофобного «переключателя» подтверждена экспериментально [33], но остается неизвестным механизм, посредством которого этот «переключатель» приводится в действие связыванием цАМФ. Модель электростатического «переключателя», напротив, объясняет, каким образом информация о связывании цАМФ передается за пределы цАМФ-связывающего сайта, однако логике этой модели противоречит факт активации ПКА с мутационными заменами R209 и D170 [34, 35].

Методы молекулярного моделирования являются перспективным подходом исследования конформационных переходов белков. Тем не менее эти методы ни разу не были применены для подтверждения моделей электростатического и гидрофобного «переключателей». А единственная попытка показать конформационный переход цАМФ-связывающего домена не принесла желаемого результата, так как белок все время моделирования оставался вблизи исходного

энергетического минимума [36].

Цель работы. Для объяснения механизма активации ПКА прежде всего надо расшифровать механизм перехода А-домена RIα из H- в B-конформацию, что и стало целью работы. В рамках поставленной цели были выделены следующие **задачи**, решаемые методами молекулярного моделирования:

1) расшифровать механизм, посредством которого связывание цАМФ запускает конформационный переход А-домена RIα;

2) определить роль электростатического «переключателя» R209–D170–R226 в конформационном переходе А-домена RIα;

3) установить роль гидрофобного «переключателя» L203–Y229 в конформационном переходе А-домена RIα;

4) описать наиболее вероятный путь перехода А-домена RIα из H- в B-конформацию.

Методологическая основа исследования. При работе над диссертацией применялась совокупность методов молекулярного моделирования. Основные результаты были получены методами молекулярной динамики. Вспомогательную роль играли квантово-химические расчеты и докинг.

Научная новизна работы. В диссертации впервые расшифрованы все этапы механизма перехода А-домена RIα из H- в B-конформацию и предложена модель электростатического «переключателя» цАМФ(O6)–A202(N-H)–G199(C=O), посредством которого цАМФ передает информацию о своем связывании на гидрофобный «переключатель» L203–Y229 и этим запускает конформационный переход А-домена. Подтверждена и дополнена существующая модель гидрофобного «переключателя» L203–Y229. Впервые установлено, что движущей силой поворота B/C-спирали, происходящего при его переключении, является на первых этапах сохранение взаимодействия между Y229 и L203, а затем повышение энергии взаимодействия Y229 с β-субдоменом в целом. Впервые показано, что для функционирования гидрофобного «переключателя» в А-домене RIα необходимо смещение N3A-мотива. Продемонстрировано, что инвариантность остатка аргинина в положении 209 не связана с его участием в электростатическом «переключателе» R209–D170–R226, а определяется рядом других функций.

Основные положения, выносимые на защиту:

1) цАМФ запускает переход А-домена регуляторной субъединицы ПКА Iα из H- в B-конформацию посредством электростатического «переключателя» цАМФ(O6)–A202(N-H)–G199(C=O), передающего информацию о связывании цАМФ на гидрофобный «переключатель» L203–Y229.

2) В переходе А-домена регуляторной субъединицы ПКА Iα из H- в B-конформацию не задействован электростатический «переключатель» R209–D170–R226. Однако аминокислотный

остаток в положении 209 выполняет ряд важных функций: (а) фиксация лиганда в связывающем сайте; (б) поддержание конформации β2β3-петли; (в) создание стерически благоприятных условий для размещения A202 в положении, характерном для B-конформации, и стабилизация этого положения путем образования взаимодействия с боковой цепью A202. Аргинин в положении 209 наилучшим образом совмещает выполнение всех перечисленных функций, что является причиной его инвариантности во всех цАМФ-связывающих доменах.

3) Переход A-домена регуляторной субъединицы ПКА Iα из H- в B-конформацию происходит в три последовательных этапа. На первом этапе в ответ на связывание лиганда B-конформацию принимает ФСК. На втором этапе происходит смещение N3A-мотива, поворот B/C-спирали и формирование в ее структуре витка π-спирали. На третьем заключительном этапе на месте витка π-спирали образуется излом, который разделяет B/C-спираль на отдельные B- и C-спирали.

Достоверность результатов исследования обеспечивается:

– учетом характеристик исследуемого белка и его конформационного перехода при подборе методов молекулярного моделирования;

– статистической обработкой данных;

– соответствием результатов работы данным литературы, полученным другими исследователями традиционными биохимическими методами.

Научная и практическая значимость работы. Результаты настоящего исследования важны для фундаментальной биохимии, так как они объясняют механизм конформационного перехода A-домена RIα как представителя большого семейства цАМФ-связывающих и родственных им доменов. Практическая значимость работы связана с тем, что белки, содержащие эти домены, выполняют важные функции в клетках, и изменение их активности часто сопровождает собой патологические состояния или приводит к ним. В этой связи полученные данные могут быть использованы для направленного поиска новых эффективных блокаторов и активаторов цАМФ-связывающих белков для дальнейшего использования в медицине.

Апробация результатов исследования. Материалы диссертации были представлены на следующих конференциях: Политехнический симпозиум «Молодые Ученые – промышленности Северо-Западного региона» (Санкт-Петербург, 2006); Двенадцатая Санкт-Петербургская ассамблея молодых ученых и специалистов (Санкт-Петербург, 2007); “The Second St.Petersburg International Conference on NanoBio Technologies NanoBio 08” (St.Petersburg, 2008); Научное наследие академика Л.А. Орбели. “Структурные и функциональные основы эволюции функций, физиологии экстремальных состояний”, Всероссийская конференция, посвященная 125-летию со дня рождения академика Л.А.Орбели (Санкт-Петербург, 2008); “Тринадцатая Санкт-

Петербургская ассамблея молодых ученых и специалистов" (Санкт-Петербург, 2008); 6-ая Всероссийская конференция "Молекулярное моделирование" (Москва, 2009); Moscow conference on computational molecular biology MCCMB`09 (Moscow, 2009); "Современная химическая физика" XXI симпозиум (Москва-Туапсе, 2009); "Third International NanoBio Conference" (Zurich, 2010); XXI Съезд Физиологического общества имени И. П. Павлова (Москва-Калуга, 2010); Пятнадцатая Санкт-Петербургская ассамблея молодых ученых и специалистов (Санкт-Петербург, 2010); 7-ая Всероссийская конференция «Молекулярное моделирование» (Москва, 2011); Первая Международная Интернет-конференция «Математическое и компьютерное моделирование в биологии и химии. Перспективы развития» (Казань, 2012); Международная конференция «Биология – наука XXI века» (Москва, 2012); The First International Conference «Quantitative imaging and spectroscopy in neuroscience» (St. Petersburg, 2012); FEBS Congress (St. Petersburg, 2013); Moscow conference on computational molecular biology MCCMB`13 (Moscow, 2013).

Публикации. Результаты диссертации опубликованы в 22 работах, в том числе в 5 статьях, 4 из которых опубликованы в журналах по перечню ВАК РФ.

Личный вклад автора. Соискатель принимала непосредственное участие в постановке задач, разрабатывала пути их решения и проводила анализ литературных данных. Все расчеты и их обработка были выполнены соискателем лично. Соискателю принадлежит ведущая роль в обсуждении результатов, подготовке статей и докладов для конференций.

Факторный и кросскорреляционный анализы, обработка результатов кластерного анализа и оценка полноты перехода А-домена в В-конформацию с помощью RMSD функций были проведены под руководством и при участии Вершининой Е. А., старшего научного сотрудника лаборатории информационных технологий и математического моделирования ФГБУН «Институт Физиологии им. И. П. Павлова РАН».

Расчеты с применением методов молекулярной динамики были выполнены на кластерах СПб Филиала МСЦ РАН (http://scc.ioffe.ru/) и Т-платформы СПбГУ, а также в вычислительном центре Аубурнского университета США при любезном содействии профессора факультета химии и биохимии М. Л. МакКи и непосредственном участии сотрудника этого центра Т. Ли.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения, выводов, списка литературы и трех приложений (А, Б и В). Работа изложена на 141 странице печатного текста, содержит 7 таблиц и иллюстрирована 21 рисунком. В списке цитируемой литературы приведено 112 источников.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Протеинкиназа А. Общие сведения

Протеинкиназа А (ПКА) была открыта в 1968 году Кребсом и сотрудниками, как фермент, фосфорилирующий белки по остаткам серина и треонина [38]. Спектр мишеней ПКА достаточно широк. К ним относятся гистоны, факторы транскрипции (CREB, CREM, ATF1, NF-κB, NF-AT и другие) [2], белки микротрубочек MAP-2 [39], Ca2+-каналы L-типа, фосфоламбан [40], гликогенсинтаза [41] и многие другие белки. Этот список постоянно пополняется, и тем самым появляются все новые подтверждения участия ПКА, если не во всех, то в большинстве клеточных процессов.

Собственно протеинкиназной активностью обладают белки, исторически получившие название каталитических субъединиц ПКА (С-субъединиц). Они представлены тремя изоформами Cα, Cβ и Cγ [1, 3].

Способность С-субъединиц фосфорилировать субстраты в отсутствие внешнего сигнала сдерживается образованием неактивных комплексов между С-субъединицами и другими пептидами и белками [3].

Наиболее изученным и, видимо, наиболее распространенным является ингибирование каталитической активности С-субъединиц с помощью белков, исторически получивших название регуляторных субъединиц ПКА (R-субъединиц). В таком случае неактивные комплексы ПКА (RC комплексы) состоят из димера R-субъединиц, каждая из которых связана с одной С-субъединицей. На настоящий момент известно четыре изоформы регуляторных субъединиц (RIα, RIβ, RIIα и RIIβ), в соответствии с чем RC комплексы также подразделяются на четыре типа: ПКА Iα, ПКА IIα, ПКА Iβ и ПКА IIβ. Изоформы регуляторных субъединиц довольно сильно отличаются друг от друга по строению и физико-химическим свойствам. Более того, они с разной эффективностью взаимодействуют с разными белками, в том числе и с выполняющими функцию заякоривания на мембранах (АКАР). Таким образом, именно от регуляторных субъединиц зависит локализация, а следовательно, выбор мишеней ПКА [1 – 3].

Несмотря на разные характеристики, все изоформы R-субъединиц обладают одним общим свойством – изменением конформации в ответ на связывание внутриклеточного мессенджера циклического аденозин-3’,5’-монофосфата (цАМФ) [1 – 3]. Сродство С-субъединиц к R-субъединицам в цАМФ-связанной форме недостаточно для поддержания стабильности RC комплекса, и он диссоциирует в присутствии субстрата, освобождая каталитически активные С-субъединицы [1 – 3, 42, 43].

Другим хорошо известным ингибитором активности С-субъединиц ПКА является пептид

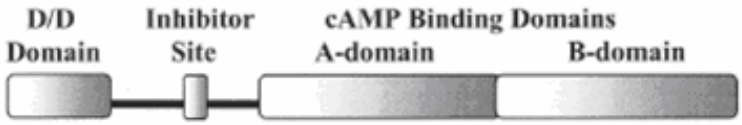
ПКИ (ингибитор протеинкиназы А). Он отличается от R-субъединиц меньшим сродством к С-субъединице, а также тем, что диссоциация каталитически неактивного комплекса, образованного с его участием, происходит независимо от цАМФ [3].

Но не только С-субъединицы, R-субъединицы также могут функционировать как самостоятельные белки. Так, RIα субъединица, помимо поддержания неактивного состояния ПКА, участвует в инактивации цитохромоксидазы [9], образует комплексы с mTOR киназой [10], рибосомальной S6 киназой 1 (RSK1) [11] и Smad3/Smad4 комплексом [12], контролирует транспорт факторов транскрипции (PATZ1) [13] и репликации (RFC40) [14] в ядро, причем некоторые из этих процессов регулируются цАМФ.

Все приведенные факты в совокупности позволяют говорить об R- и С-субъединицах как о независимых белках, исторически получивших не совсем корректные названия. А описание механизма цАМФ-индуцируемых конформационных изменений R-субъединиц становится важно не только для понимания активации ПКА, но и для объяснения функционирования других белковых комплексов.

1.2. Доменная структура RIα субъединицы[1]

RIα субъединица представляет собой белок массой 490 кДа и имеет по ходу аминокислотной последовательности следующие структуры (рисунок 1.1): домен димеризации (а. о. 12 – 60), линкерный участок (а. о. 61 – 120) и два последовательных цАМФ связывающих домена, А (а. о. 121 – 244) и В (а. о. 245 – 379) [1, 44, 45].



На рисунке представлены: домен димеризации (D/D Domain), ингибиторная последовательность (Inhibitor Site) и цАМФ-связывающие домены А и В (cAMP Binding Domains: A-domain, B-domain). Рисунок взят из [44]

Рисунок 1.1 – Доменная структура регуляторной субъединицы ПКА Iα

Домены димеризации двух R-субъединиц формируют стабильную структуру типа бочонка (4 helix bundle), приводя таким образом к образованию регуляторного димера. Строение такого димера способствует реализации межмолекулярных контактов между цАМФ-связывающими А-доменами, благодаря чему во взаимодействии цАМФ с одноименными сайтами связывания и в цАМФ-зависимой активации ПКА появляется положительная

[1] Данная работа посвящена ПКА Iα, поэтому в обзоре литературы будет рассматриваться только Iα изоформа R-субъединицы

кооперативность [46]. Важно отметить, что об этой кооперативности можно судить по значениям коэффициента Хилла, в отличие от положительной кооперативности между A- и B-доменами в пределах одной R-субъединицы. Последняя маскируется разным сродством A- и B-сайтов к цАМФ и может быть обнаружена только с применением сайт-специфических аналогов. Собственно значения констант связывания R-субъединицы с цАМФ или C-субъединицей мало зависят от присутствия домена димеризации, поэтому часто в экспериментальных работах вместо RIα субъединицы используют ее делеционный мутант (Δ1-91)RIα [47].

Помимо обеспечения существования R-субъединиц в форме димера важной функцией домена димеризации является то, что он несет сайты связывания других белков, в том числе AKAPs [48]. Таким образом, домен димеризации принимает непосредственное участие в фиксации ПКА на поверхности мембраны и в образовании многофункциональных белковых комплексов.

Линкерный участок, следующий за доменом димеризации, – самый конформационно нестабильный фрагмент R-субъединицы ПКА. Однако присутствие C-субъединицы способствует формированию в нем элементов вторичной структуры [48].

Часть линкерного участка представлена ингибиторным пептидом (94 – 98), имеющим вид псевдосубстратной (для RI изоформ) или субстратной (для RII изоформ) последовательности [49]. Ингибиторный пептид взаимодействует с активным сайтом C-субъединицы и имеет решающее значение для формирования стабильного RC комплекса. В его отсутствие R- и C-субъединицы не взаимодействуют друг с другом [47]. И напротив, если ингибиторный пептид имеется, то связь между ним и C-субъединицей не разрывается даже в присутствии цАМФ, а происходит конкурентное вытеснение R-субъединицы субстратом в соответствии с законом действующих масс [42, 43].

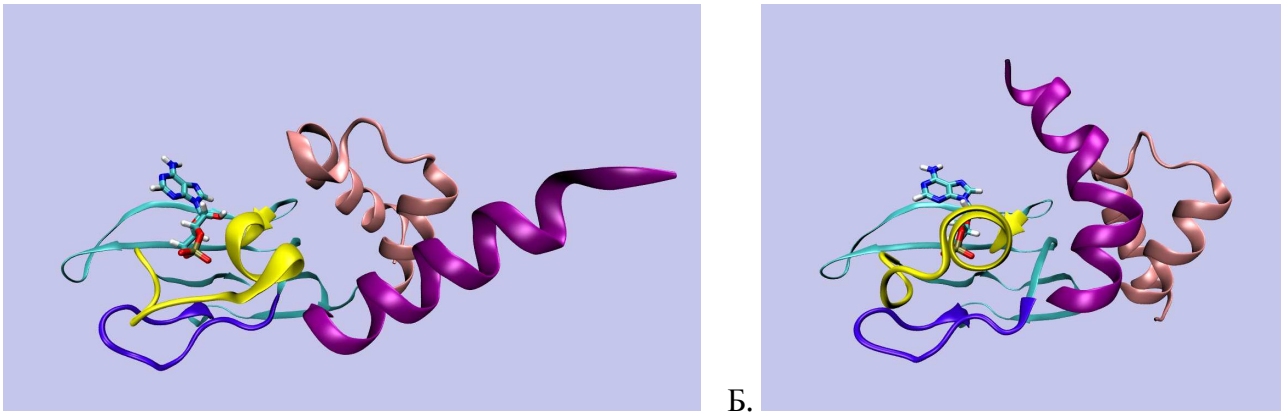
Помимо ингибиторного пептида, в линкерном участке есть сайты связывания других белков, например, пролин направляемых киназ или белков, несущих SH3 домены [48]. Таким образом, линкерный участок наравне с доменом димеризации принимает участие в формировании межбелковых комплексов.

Следом за линкерным участком, если двигаться от N-конца R-субъединицы к C-концу, расположены два последовательных цАМФ-связывающих домена, гомологичных друг другу, но имеющих каждый свои особенности строения. При связывании цАМФ оба домена претерпевают схожие конформационные переходы, благодаря которым сродство R- и C-субъединиц друг к другу существенно ослабевает [1, 3, 5]. Этот процесс настолько важен для понимания функционирования ПКА и других белков, с которыми R-субъединица формирует цАМФ-зависимые комплексы, что мы решили вынести рассмотрение цАМФ-связывающих доменов в самостоятельный раздел обзора литературы.

1.3. цАМФ-связывающие домены

1.3.1. Строение цАМФ-связывающих доменов

Домены, связывающие циклические нуклеотиды (цАМФ и цГМФ), широко представлены в протеомах разнообразных организмов. Они входят в состав транскрипционных факторов прокариот (CAP и другие) [15 – 18], HCN каналов (собственно HCN [19] и spIH [20]), CNG каналов [21], белков EPAC [22, 23], протеинкиназ А [24] и Г [25, 26], а также присутствуют в ряде других белков, функции которых пока не известны [50]. Строение цАМФ-связывающих доменов в двух присущих им конформациях (H и B) показано на рисунке 1.2 на примере А-домена R-субъединицы ПКА Iα.



А – H-конформация; Б – B-конформация. Бирюзовым цветом показан β-складчатый субдомен (кроме ФСК и β2β3-петли), фиолетовым – β2β3-петля, желтым – ФСК, розовым – N3A-мотив, пурпурным – B/C-спираль в H-конформации и B- и C-спирали в B-конформации. Показан цАМФ в связывающем сайте.
В основу рисунка положены данные рентгеноструктурного анализа (PDB ID 3PVB и 1NE6 для H- и B-конформаций соответственно) [29, 27]

Рисунок 1.2 – Третичная структура цАМФ-связывающего домена RIα на примере А-домена

Обе конформации в отсутствие каких-либо внешних факторов находятся в состоянии равновесия друг с другом, причем доля каждой из них зависит от конкретного домена [30, 31]. Если в системе присутствует агент, стабилизирующий одну из конформаций, то равновесие, очевидно, смещается в ее сторону. Так, для всех цАМФ-связывающих доменов агентами, стабилизирующими B-конформацию, являются цАМФ или другие агонисты цАМФ-связывающих белков. А H-конформацию А-домена RIα делает устойчивой присутствие C-субъединицы [31].

В третичной структуре цАМФ-связывающих доменов выделяют два субдомена: β-складчатый и α-спиральный. β-субдомен, обладает укладкой типа «рулет с джемом» (jelly roll), но в отличие от классического «рулета» содержит короткую B`-спираль между β6 и β7 тяжами [45, 51]. Эта спираль является основой лиганд-связывающего сайта. За исключением нее, β-

субдомен мало подвержен конформационным изменениям. α-субдомен, напротив, конформационно подвижен. Он состоит из N3A-мотива (N-спираль, 3_{10}-спираль, A-спираль), предваряющего β-субдомен, и двух С-концевых B- и C-спиралей, способных в некоторых доменах (например, А-доменах R-субъединиц ПКА) формировать единую B/C-спираль [45]. В основе конформационного перехода цАМФ-связывающих доменов лежит передача информации о связывании лиганда с β-субдомена на α-субдомен, что сопровождается существенной перестройкой последнего. Конкретный механизм этого процесса пока мало изучен.

В соответствии с данными, полученными в лаборатории Сьюзен Тэйлор [45], конформационные переходы цАМФ-связывающих доменов осуществляются за счет взаимодействия четыре консервативных надвторичных структур: фосфат-связывающей кассеты (ФСК), β2β3-петли, B/C-спирали и N3A-мотива (рисунок 1.2). Первые две из них входят в состав β-субдомена, а вторые, как уже упоминалось, расположены в α-субдомене.

Под названием «фосфат-связывающая кассета» (ФСК) объединены С-конец β6 тяжа, N-конец β7 тяжа и B`-спираль между ними F198 – A211 (F322 – A335)[2] [24, 45], обозначенные на рисунке 1.2 желтым цветом. Аминокислотные остатки, входящие в состав ФСК, образуют водородные связи с сахаро-фосфатной частью цАМФ, что и дало название этой структуре. Методом рентгеноструктурного анализа установлено [6, 27], что в B-конформации водородные связи с цАМФ образует пять аминокислотных остатков ФСК G199 (G323), E200 (E324), A202 (A326), R209 (R333) и A210 (A334), причем все они являются инвариантными.

Строение B`-спирали ФСК зависит от конформации домена. В H-конформации она представлена 3_{10}-спиралью G199 – I204 (E324 – L328) [4], а в B-конформации вместо нее реализуется более длинная α-спираль G199 – G206 (G323 – N330) [6, 27].

Под ФСК расположен второй консервативный участок цАМФ-связывающих доменов – β2β3-петля (петля между β-слоями под номерами 2 и 3), представленная последовательностью I163 – N171 (V281 – E289) [45]. На рисунке 1.2 она выделена фиолетовым цветом. Согласно существующим данным G169 (G287), входящий в состав этой петли, образует CH-π взаимодействие с гуанидиновой группой R209 (R333) [52], что имеет существенное значение для конформационного перехода цАМФ-связывающих доменов. Второй значимый остаток β2β3-петли D170 образует в B-конформации ионную связь с R209 [53]. В B-домене данная связь не реализуется, несмотря на наличие гомологичного остатка D288 [4, 5, 53].

Следом за β-субдоменом, если двигаться от N-конца белка к С-концу, находится третий консервативный участок (пурпурный на рисунке 1.2) D225 – Y244 (D349 – F374), включающий

[2] Здесь и далее рассматривается аминокислотная последовательность А-домена RIα, а в скобках приводятся гомологичные остатки B-домена.

в себя B- и C-спирали. У A-домена RIα в H-конформации они объединены в единую B/C-спираль, а в B-конформации расположены под углом друг к другу. В B-домене, независимо от его конформации, B- и C-спирали всегда существуют в форме отдельных спиралей [4, 6, 45].

У всех цАМФ-связывающих доменов в H-конформации C-конец C-спирали удален от ФСК, но в B-конформации приближается к ней и образует связи с лигандом и аминокислотными остатками β-субдомена. Основополагающим при этом является взаимодействие (в большинстве случаев π-электронное) между ароматическим кольцом лиганда и боковой цепью аминокислотного остатка, называемого в литературе кэпом [54]. Положение кэпа в первичной последовательности цАМФ-связывающих доменов не консервативно, и вероятно, что его функции берет на себя любой остаток, свойства которого и положение в пространстве способствуют образованию такого взаимодействия. Судя по данным, приведенным в PDB и в базах первичных последовательностей, необходимыми свойствами обладают остатки тирозина, триптофана, аргинина, пролина или лейцина. А нужное положение в пространстве достижимо, если остаток кэпа находится на C-конце C-спирали или в начале домена, следующего за рассматриваемым. Там в B-домене RIα кэпом является остаток C-спирали Y371, а в A-домене RIα – остаток N3A-мотива B-домена W260 [6]. Тот факт, что кэп A-домена находится в B-домене, вероятно, приводит к появлению положительной кооперативности между сайтами связывания цАМФ и повышению стабильности B-конформации R-субъединицы. Интересно, что у мутантов с делецией B-домена роль кэпа A-домена берет на себя Y244, находящийся на C-конце C-спирали [55].

Четвертый консервативный участок цАМФ-связывающего домена – N3A-мотив K121 – M151 (E245 – L269) – выделен на рисунке 1.2 розовым цветом. Он состоит из N-концевой N-спирали, C-концевой A-спирали и короткого неструктурированного или несущего черты 3_{10}-спирали фрагмента между ними [45]. N3A-мотив не взаимодействует напрямую с лигандами, однако по данным ЯМР анализа [56] после связывания агониста в его структуре наблюдаются некоторые изменения. Несмотря на очевидное участие N3A-мотива в конформационном переходе, у некоторых транскрипционных факторов прокариот он отсутствует, и по этой причине N3A-мотив долго не включали в состав цАМФ-связывающих доменов. Даже в последней версии базы данных SCOP (Structural Classification of Proteins, v1.75 от июня 2009) они отнесены к классу полностью β-белков с укладкой типа «рулет с джемом». Тем не менее такое представление о цАМФ-связывающих доменах представляется некорректным, и в исследовании, проведенном в лаборатории Сьюзен Тэйлор [45], доказано, что N3A-мотив, безусловно, является их структурным элементом.

цАМФ-связывающие домены могут содержать сайты связывания различных белков. Очевидный пример этому – поверхность, формируемая A- и B-доменами R-субъединицы для

взаимодействия с С-субъединицей. Кроме того, на С-конце В-домена RIα расположен сайт для связывания PDZ доменов; взаимодействие с ним происходит в отсутствие цАМФ [57]. Вероятно, существуют и другие сайты связывания, но о них пока известно мало.

В регуляторных субъединицах протеинкиназ А два цАМФ-связывающих домена (А и В) расположены друг за другом таким образом, что в Н-конформации N-спираль В-домена (N-концевая спираль N3A-мотива) является продолжением B/C-спирали А-домена. При связывании цАМФ оба домена переходят из Н- в В-конформацию, при этом центральная «B/C/N» спираль ломается на три отдельных спирали, а А- и В-домен приближаются друг к другу, формируя между собой многочисленные контакты. Эти контакты стабилизируют цАМФ-связанную форму R-субъединицы (условно назовем ее В-конформацией R-субъединицы), не позволяя ей снова ассоциировать с С-субъединицей, пока цАМФ находится в связывающих сайтах.

1.3.2 Модели конформационного перехода цАМФ-связывающих доменов

Разностороннее исследование цАМФ-связывающих доменов привело к развитию представлений о двух аллостерических «переключателях», благодаря которым информация о связывании цАМФ передается с β-субдомена на α-субдомен, и весь домен целиком осуществляет переход из одной конформации в другую.

Первый «переключатель», электростатический, был обнаружен в А-домене RIα [5, 32]. Там он представлен тремя взаимодействующими аминокислотным остатками: R209 (ФСК), D170 (β2β3-петля) и R226 (В-спираль), причем боковая цепь D170 в Н-конформации связана с R226, а в В-конформации – с R209. Модель электростатического «переключателя» полагает начало конформационному переходу домена в изменении свойств R209 при связывании лиганда и следующем из этого «переключении» боковой цепи D170 с R226 на R209. Потеря связи между В-спиралью и β2β3-петлей (R226 – D170) и служит механизмом передачи информации о связывании лиганда на α-субдомен. В качестве доказательств модели электростатического «переключателя» приводят дестабилизацию В-конформации у мутантов D170A[3], а также блокирование конформационного перехода А-домена антагонистом ПКА Rp-цАМФS, происходящее, по предположению авторов модели, из-за нарушения свойств связи Rp-цАМФS с R209 [5]. Однако ряд экспериментальных свидетельств ставит аллостерическую роль электростатического «переключателя» под сомнение. Во-первых, только R209 из всех аминокислотных остатков, входящих в его состав, является инвариантным, а D170 и R226 даже не консервативны [4, 15 – 23]. Во-вторых, конформационый переход цАМФ-связывающих

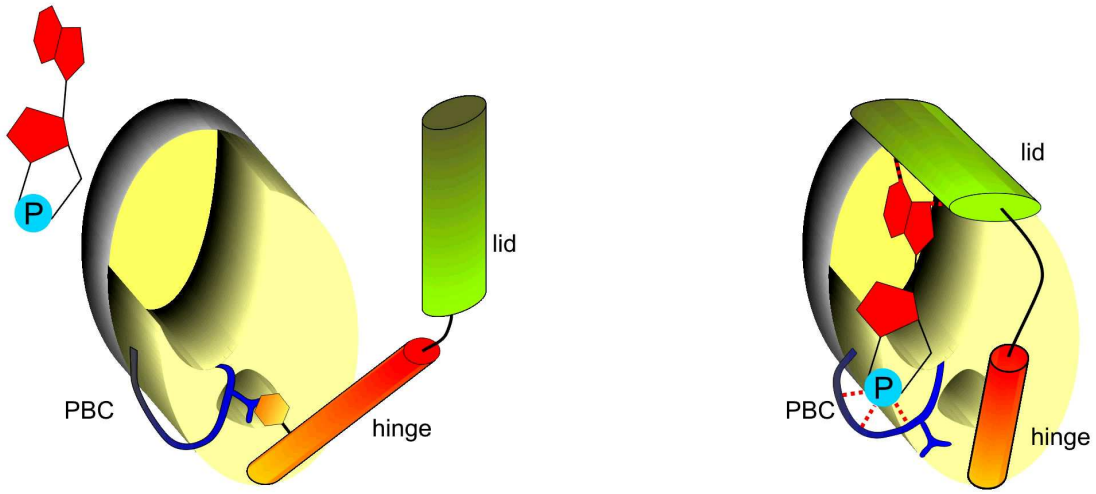
[3] RIα субъединицы с мутацией D170A ассоциируют с С-субъединицей одинаково быстро, независимо от наличия цАМФ в связывающих сайтах [35].

доменов может протекать самопроизвольно [5, 30, 31], а следовательно, изменение свойств R209 при связывании лиганда не должно служить его основной причиной. И наконец в-третьих, показано, что мутационные замены D170 [32, 35, 58] не нарушают конформационного перехода А-домена RIα, а мутационные замены R209 на остатки I, T, K, S, W, N, E в разной степени ухудшают активацию ПКА Iα, но не делают ее невозможной [34].

Одновременно с обнаружением электростатического «переключателя», группе Хольгера Рехманна на модели цАМФ-связывающего домена белка EPAC удалось показать существование гидрофобного «переключателя» [30, 33]. В работе этого «переключателя» принимают участие два инвариантных остатка, один из которых принадлежит ФСК (L203), а другой – В-спирали (Y229). Согласно предположению Рехманна, в основе конформационных переходов цАМФ-связывающих доменов лежит шарнирный механизм, представленный подвижным соединением В-спирали и β-субдомена, а сам переход заключается в повороте В-спирали в рамках степени свободы, установленной шарниром (рисунок 1.3). В Н-конформации этот поворот заблокирован положением L203, боковая цепь которого как бы упирается в ароматическое кольцо Y229. При связывании лиганда L203 смещается, шарнир оказывается разблокированным, и В-спираль поворачивается на заданный угол. В работах других авторов, ссылающихся на данные Рехманна [5], процессам снятия и постановки блока на шарнир дано название гидрофобного «переключателя».

Модель гидрофобного «переключателя» в отличие от модели электростатического «переключателя» доказана экспериментально. Так, продемонстрировано [33], что замена L203 на более объемный триптофан блокирует конформационный переход, а замены Y229 на аланин и треонин, напротив, дестабилизируют Н-конформацию. Однако существующее представление о гидрофобном «переключателе» не является полным по причине отсутствия данных о механизме, благодаря которому связывание цАМФ приводит к смещению L203. В последних работах предполагается [5], что гидрофобный «переключатель», помимо L203, может включать в себя и другие гидрофобные остатки ФСК, как-то L201, I204 и A202, последний из которых образует водородную связь с цАМФ. Но конкретная роль этих остатков в инициации конформационных изменений цАМФ-связывающих доменов в данных работах не рассматривается.

Таким образом, процессы, запускаемые цАМФ в ФСК и β2β3-петле, и механизмы их передачи на α-субдомен изучены не в полной мере, и вопрос о механизме конформационных изменений цАМФ-связывающих доменов остается на настоящий момент открытым.



А. Б.

А – Н-конформация; Б – В-конформация. Рисунок взят из [30]. PBC – ФСК, hinge – шарнир, предсталенный В-спиралью, lid – С-спираль, несущая остаток кэпа

Рисунок 1.3 – Шарнирный механизм, лежащий в основе конформационных переходов цАМФ-связывающих доменов

1.3.3. Лиганды цАМФ-связывающих доменов

Несмотря на то, что в последнее время становятся известными все новые пути цАМФ-независимой активации протеинкиназы А (например, Smad3/Smad4 комплексом [12], рибосомальной S6 киназой 1 [11], 6-бензиламинопурином [59]), единственными универсальными лигандами всех цАМФ-связывающих доменов остаются циклические нуклеотиды. Особое место среди них занимает внутриклеточный мессенджер циклический аденозин-3’,5’-монофосфат (цАМФ). Его строение и нумерация атомов согласно номенклатуре IUPAC приведены на рисунке 1.4.

цАМФ, безусловно, является агонистом всех цАМФ-связывающих белков, и только с протеинкиназой Г он практически не взаимодействует [60]. Остальные циклические нуклеотиды могут с разной эффективностью быть агонистами, антагонистами и обратными агонистами цАМФ-связывающих белков или же вообще не иметь сродства к цАМФ-связывающим доменам. При этом действие, которое циклический нуклеотид оказывает на цАМФ-связывающий белок, зависит не только от строения циклического нуклеотида, но и от деталей структуры связывающего сайта белка. Так, например, N6-фенил-цАМФ (агонист всех изоформ ПКА) имеет повышенную аффинность к А-доменам ПКА (в 18 и 40 раз превышающую аффинность цАМФ для RI и RII субъединиц соответственно), меньшую в два раза по сравнению с цАМФ аффинность к В-доменам ПКА и является антагонистом белка EPAC [61, 30].

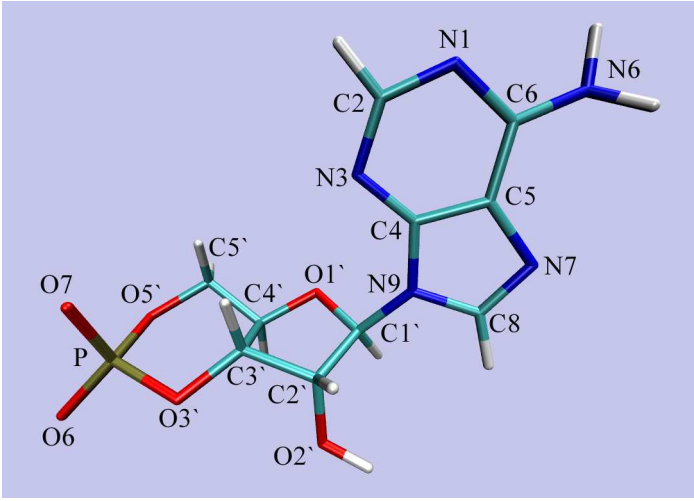


Рисунок 1.4 – Нумерация атомов в цАМФ согласно номенклатуре IUPAC

Следующие закономерности можно назвать общими для взаимодействия лигандов с цАМФ-связывающими доменами всех изоформ протеинкиназ А:

1) ароматическое кольцо и гидрокси-группа в 2`-положении важны для связывания лиганда с А- и В- сайтами. Показано, что 2`-дезокси-аналоги цАМФ как активаторы ПКА Iα в 4000 раз слабее цАМФ [62], а лиганды, лишенные ароматического фрагмента, на настоящий момент не известны. Причем не только производные пуринов или пиримидинов могут активировать ПКА: подобным же свойством обладает TzMP, несущий вместо азотистого основания тиазолкарбоксамид [63].

2) модификации азотистого основания, повышающие электронную плотность на атомах C6–N1–C2, уменьшают аффинность лигандов к связывающим сайтам всех изоформ ПКА. Предположительно этим свойством объясняется высокая (в 100 – 1000 раз) селективность ПКА по отношению к цАМФ в сравнении с цГМФ [61].

3) модификации азотистого основания, вызывающие смещение электронной плотности с C2 на C8, благоприятствуют связыванию лиганда с В-сайтом RI субъединицы, но делают невыгодным его взаимодействие с А-сайтами всех изоформ ПКА [61].

4) Лиганды, имеющие объемные заместители у атомов N6 и C8, отличаются повышенным сродством соответственно к А- и В-сайтам ПКА. Крупные фрагменты у атома C2 всегда приводят к пониженной аффиности лиганда к А-сайту, а на связывание с В-сайтом наличие объемного заместителя в этом положении не оказывает влияния [61].

Особый интерес представляют серузамещенные аналоги циклических нуклеотидов, у которых атом серы занимает положение одного из экзоциклических атомов кислорода фосфатного кольца O6 или O7 [5, 7, 27]. Sp-диастереомерные аналоги, у которых замещен атом кислорода O7, (например, Sp-цАМФS) являются агонистами протеинкиназ А, хотя и отличаются меньшей аффинностью к связывающим сайтам, чем соответствующие незамещенные лиганды

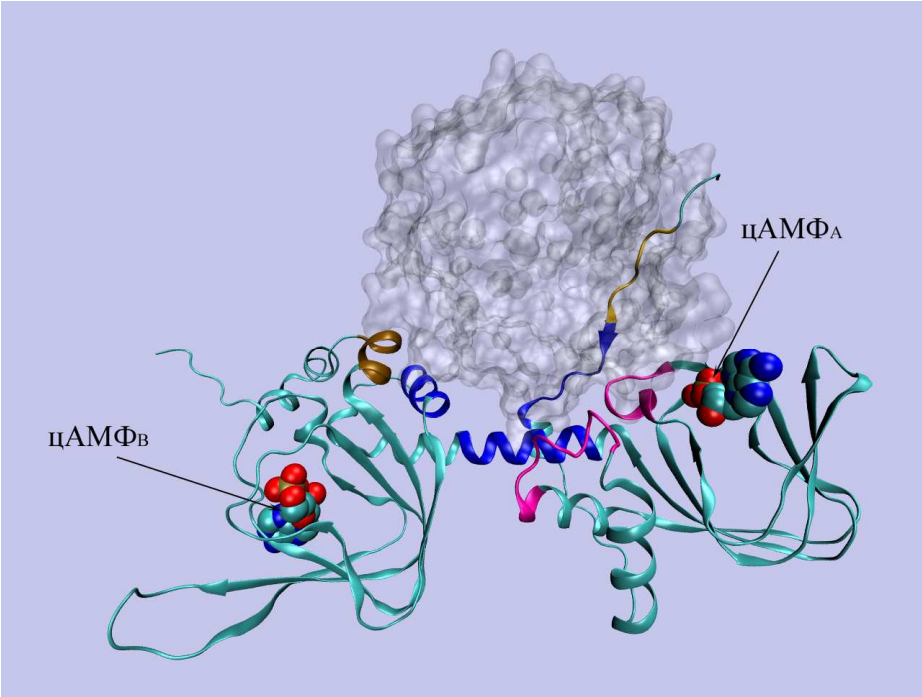
[64]. Rp-диастереомерные аналоги, у которых замещен атом кислорода O6, (например Rp-цАМФS) проявляют себя как обратные агонисты ПКА, понижая константу диссоциации RC комплекса примерно на порядок по сравнению со спонтанной [65]. Аналогичное действие Rp-аналоги оказывают на белок EPAC [66]. Точный механизм обратного агонизма Rp-диастереомеров циклических нуклеотидов на настоящий момент не известен. Предполагается, что они имеют повышенное сродство к H-конформации цАМФ-связывающих доменов, а также блокируют конформационный переход последних путем разобщения электростатического «переключателя» [5, 65]. Тем не менее методом рентгеноструктурного анализа показано, что при определенных условиях Rp-цАМФS формирует комплексы с RIα субъединицей, представленные ее B-конформацией [27]. Кроме того, в случае с ПКА Iα существует по крайней мере две группы условий эксперимента, при которых Rp-аналоги циклических нуклеотидов являются слабыми агонистами протеинкиназы А. Первая группа условий связана с подбором концентраций субстрата и Rp-аналога (например Rp-цАМФS): субстрат должен быть в избытке [34], а концентрация Rp-цАМФS относительно мала (прим. автора диссертации). Вторая группа условий включает в себя необходимость наличия в цАМФ-связывающем сайте А-домена мутаций, препятствующих связыванию лиганда [34, 64]. Эти факты должны иметь исключительное значение для понимания роли циклических нуклеотидов в механизме инициации конформационных изменений АМФ-связывающих доменов.

1.4. Диссоциация RIα:C комплекса при цАМФ-индуцированной активации ПКА Iα

Минимальным фрагментом RIα, обладающим способностью формировать стабильный каталитически неактивный и при этом активируемый цАМФ RC комплекс, является RIα (а. о. 94 – 235) [67]. В него входит ингибиторный пептид и весь А-домен RIα, за исключением C-спирали. Структуры RC комплексов, содержащих весь А-домен, RIα(91–244):C[4] (PDB ID 3FHI) [28], или оба цАМФ-связывающих домена, RIα(91–379):C (PDB ID 2QCS)[5] [4], были впервые расшифрованы в 2005 и 2007 годах. Результатом этих исследований стало выделение в стабилизирующих RC комплекс контактах четырех сайтов связывания (рисунок 1.5). Первые два из этих сайтов присутствуют в минимальном RIα(93–235):C комплексе, первые три – в комплексе RIα(93–260):C, а благодаря четвертому сайту с C-субъединицей оказывается связан B-домен RIα.

[4] Здесь и далее такая форма записи используется для обозначения RC комплексов, для которых указано, какой фрагмент R-субъединицы участвует в их образовании. Диапазон остатков этого фрагмента приведен в скобках.

[5] В структуре 2QCS B-домен несет мутацию инвариантного остатка R333, участвующего в связывании цАМФ (R333K). Получить структуру комплекса RIα(91–379):C дикого типа до сих пор не удалось.



В основу рисунка положены данные рентгеноструктурного анализа (PDB ID 2QCS) [4]. С-субъединица показана поверхностью серого цвета, RIα субъединица – бирюзовыми лентами. Желтым цветом обозначен первый сайт связывания R- и С-субъединиц, малиновым – второй, синим – третий, коричневым – четвертый. В цАМФ-связывающие сайты А- и В-доменов путем выравнивая пространственных структур RIα в B- и H-конформациях (подробнее раздел 2.5.1) помещены молекулы цАМФ (цАМФ$_A$ и цАМФ$_B$ для А- и В-сайтов соответственно)

Рисунок 1.5 – Строение комплекса RIα(91–379):C с мутацией R333K в В-домене

Первый сайт связывания (выделен желтым цветом на рисунке 1.5) включает в себя аминокислотные остатки, обеспечивающие взаимодействие ингибиторного пептида RIα (а. о. 94 – 98) с активным сайтом С-субъединицы. Это взаимодействие характерно для всех субстратов и псевдосубстратов ПКА, и его разрушение не является цАМФ-зависимым процессом [4, 42].

Второй сайт связывания (показан малиновым цветом на рисунке 1.5) образован со стороны R-субъединицы N3A-мотивом и ФСК А-домена. Ключевым взаимодействием при этом является водородная связь Y247(C-субъединица)–Y205(R-субъединица), поддерживаемая рядом контактов между гидрофобными остатками ФСК и С-субъединицы. Исходя из участия в этом блоке контактов ФСК А-домена, было предположено [4], что цАМФ-связывающий сайт А-домена в составе RC комплекса недоступен для лиганда и связывает его только после конформационных изменений В-домена. Такая гипотеза подтверждается данными исследования А- и В-сайтов RC комплекса [68], свидетельствующими в пользу связывания цАМФ сначала с В-, а только потом с А-доменом. Однако ей противоречит возможность цАМФ-индуцированной активации RC комплексов, лишенных В-домена или содержащих в нем мутации, препятствующие связыванию цАМФ [67, 69].

В третьем сайте межсубъединичных контактов (выделен синим цветом на рисунке 1.5)

задействованы со стороны R-субъединицы в основном аминокислотные остатки B/C-спирали A-домена. Также в него входит часть линкерного участка (а. о. 99 – 106) и A-спираль B-домена (C-концевая спираль N3A-мотива). Особо стоит отметить остаток W260, который в цАМФ-связанной форме R-субъединицы играет роль кэпа A-домена, а в RC комплексе фиксирован на поверхности C-субъединицы [4] на расстоянии около 40Å от соответствующей ФСК. Изменение его положения при переходе R-субъединицы из H- в B-конформацию показывает масштабность конформационных перестроек последней.

Наконец, четвертый сайт (обозначен коричневым цветом на рисунке 1.5) включает в себя связи, образованные со стороны R-субъединицы аминокислотными остатками B-спирали B-домена. Имеются данные (полученные методом малоуглового рассеяния), свидетельствующие в пользу стабильности этого сайта только у RC комплекса с мутационной заменой R333K [70]. У белка дикого типа соответствующие связи то образуются, то разрушаются, что приводит к существованию RC комплекса в виде ансамбля конформаций с неопределенным положением B-домена. С этим фактом, видимо, связаны неудачи в получении кристаллической структуры комплекса RIα(91–379):C дикого типа [4].

Диссоциация RC комплекса сопровождается разрывом всех четырех сайтов связывания и, если речь идет о цАМФ-индуцированной активации ПКА Iα, то переходом RIα в B-конформацию.

Важное дополнение к приведенному структурному описанию дают значения констант активации и диссоциации RC комплексов, R-субъединицы которых несут разнообразные делеции [67]. Интересно, что значения констант активации таких комплексов изменяются нелинейно при увеличении фрагмента RIα. Так, значение константы активации RIα(93–235):C комплекса приблизительно в 2 раза выше, чем у комплекса, образованного с участием RIα дикого типа. Включение C-спирали A-домена в состав фрагмента RIα (комплекс RIα(94–244):C) приводит к возрастанию константы активации еще в 3–4 раза. А если фрагмент RIα содержит также A-спираль B-домена (комплекс RIα(93–259):C), то значение константы активации соответствующего комплекса превышает значение для комплекса дикого типа уже на порядок. С другой стороны, значения констант цАМФ-независимой диссоциации рассмотренных комплексов всегда уменьшаются с ростом фрагмента RIα, что хорошо согласуется с сопровождающим этот рост увеличением числа сайтов связывания между R- и C-субъединицами [67]. Только при переходе от комплекса RIα(91–244):C к комплексу RIα(91–379):C значение константы диссоциации практически не изменяется [42, 35].

На основании приведенных данных был сделан вывод [32] о ключевой роли взаимодействий, заключенных в первых трех сайтах связывания, в стабилизации RC комплекса,

и особом значении B-домена для обеспечения эффективной активации ПКА Iα при относительно невысоких концентрациях цАМФ. Было предположено [32], что цАМФ-индуцированное изменение конформации B-домена необходимо для смещения C-спирали A-домена с поверхности C-субъединицы и облегчения, таким образом, цАМФ-зависимой диссоциации RC комплекса. Часто при описании этого процесса B-домен называют «привратником» [32]. Такое название обусловлено гипотезой, согласно которой до конформационного перехода B-домена и смещения C-спирали связь цАМФ с A-доменом невозможна. Как мы уже отмечали, такая гипотеза встречает много противоречий со стороны экспериментальных данных. Тем не менее с чем бы ни сравнивали B-домен, его роль в уменьшении значения константы активации ПКА Iα можно считать доказанной.

Еще одним важным результатом является относительно высокое сродство RIα субъединицы, находящейся в B-конформации, к C-субъединице [43]. Оно обусловлено тем, что разрыв взаимодействия между каталитическим сайтом C-субъединицы и ингибиторным пептидом R-субъединицы не является цАМФ-зависимым процессом. RC комплекс, стабилизированный этим взаимодействием, диссоциирует самопроизвольно, и в присутствии высокой концентрации субстрата равновесие реакции диссоциации смещается практически полностью в сторону свободных R- и C- субъединиц [42].

Итогом всех предпринятых исследований стало описание механизма диссоциации RC комплекса или, что то же самое, механизма активации ПКА Iα [4]. Согласно этому механизму сначала происходит цАМФ-зависимый переход B-домена в B-конформацию, результатом которого является смещение C-спирали A-домена с поверхности C-субъединицы. Затем B-конформацию принимает A-домен[6]. И в завершении RC комплекс в присутствии субстрата диссоциирует на отдельные R- и C-субъединицы.

Главным недостатком предложенного механизма является его недостаточная детализация. А получить детальное описание активации ПКА Iα без знаний о конформационных переходах отдельных цАМФ-связывающих доменов представляется вряд ли возможным.

1.5. Заселенность конформаций отдельных цАМФ-связывающих доменов и R-субъединицы

Для цАМФ-связывающих доменов характерно состояние динамического равновесия между H- и B-конформациями [30, 31]. На положение этого равновесия влияют различные

[6] В соответствии с предложенной гипотезой о недоступности A-сайта лиганду цАМФ связывается с A-доменом после конформационных изменений B-домена. Но в какой конкретно момент это происходит, в работах не упоминается.

факторы, как-то: окружающие белки, низкомолекулярные лиганды или же фрагменты белковой цепи, предшествующие или следующие за цАМФ-связывающим доменом.

С использованием метода ЯМР установлено, что H- и B-конформации A-домена ПКА Iα (91-244) стабильны в равной мере (G_B~G_H) [31], хотя по данным рентгеноструктурного анализа A-домену в отсутствие лигандов свойственна только B-конформация [5]. Это разногласие, видимо, обусловлено тем, что A-домены, представленные B-конформацией, могут быть более выгодно упакованы в кристалле. Присутствие любого из агонистов, например, цАМФ или Sp-цАМФS смещает существующее равновесие в сторону B-конформации. Частичные агонисты A-домена, такие как O2′-метил-цАМФ тоже увеличивают заселенность B-конформации, но в меньшей степени, чем полные агонисты [31]. Высокая доля H-конформации достигается у A-домена в присутствии C-субъединицы или обратного агониста Rp-цАМФS. Тем не менее последний эффективно стабилизирует H-конформацию, только если связывается с RC комплексом [5]. В случае взаимодействия Rp-цАМФS со свободным A-доменом, увеличение заселенности H-конформации оказывается меньшим чем то, которое наблюдается при связывании свободного A-домена с C-субъединицей [31]. Также равновесие A-домена смещается в сторону H-конформации при удалении линкерного фрагмента (а. о. 91 – 118), причем в этом случае устойчивость B-конформации снижается, даже если в цАМФ-связывающем сайте находится цАМФ [31].

Равновесие между конформациями свойственно и цАМФ-связывающему домену белка EPAC1 [30]. У этого домена заселенность H-конформации несколько выше, чем B, и составляет менее 80%.

Исследований конформационного равновесия изолированного B-домена RIα не проводилось. Тем не менее как уже отмечалось в предыдущем разделе, этот домен в составе RC комплекса не образует стабильных взаимодействий с C-субъединицей и поэтому значительную часть времени проводит в свободном состоянии. Какая конформация предпочтительней для него, на настоящий момент неизвестно. Но рассуждения, приведенные в разделах 3.5.4 и 4.3.2 настоящей диссертации, дают основание полагать, что в этом случае равновесие сдвинуто в сторону B-конформации. Это предположение, однако, не относится к RII изоформам ПКА. У этих изоформ контакты B-домена с C-субъединицей стабильны, и B-домен в составе RC комплекса находится в H-конформации [71].

Для RIα субъединицы, состоящей из двух цАМФ-связывающих доменов, тоже характерно равновесие между несколькими конформациями. При этом, говоря о конформации R-субъединицы, часто подразумевают конформацию A-домена в составе R-субъединицы. Так как именно состояние A-домена обуславливает форму и размеры белка, которые можно определить экспериментально [31].

В соответствии с данными, полученными методом ЯМР анализа [42], H- и B-конформации A-домена в составе RIα(91–379), как и в случае отдельного A-домена, характеризуются одинаковой стабильностью. В присутствии агонистов у обоих доменов заселена преимущественно B-конформация. А в случае взаимодействия обратного агониста Rp-цАМФS со свободной RIα, равновесие, по крайней мере A-домена, смещается в сторону H-конформации [5, 7]. Последние данные получены путем исследования изменения свободной энергии при индуцированном мочевиной анфолдинге и спектрометрии ионной подвижности / масс спектрометрии RIα(91–379). В то же время существует кристаллическая структура комплекса RIα с Rp-цАМФS, представленная B-конформацией RIα [27]. Важная информация для объяснения возникшего разногласия, на наш взгляд, заключается в методике приготовления этой структуры, о чем пойдет речь в разделе 4.3.2 настоящей диссертации.

1.6. Константы, характеризующие активацию ПКА Iα

1.6.1. Значения констант, характеризующих активацию ПКА Iα

Константы скоростей реакций, равновесные константы, а также константы активации – важные показатели, на которые должна опираться и которые должна объяснять любая модель активации протеинкиназы А, как феноменологическая, так и полученная методом молекулярного моделирования. Тем не менее авторы, видимо, недооценивают значимость определенных ими констант для понимания функционирования ПКА. Иначе каким образом можно объяснить отсутствие в большинстве работ данных о температуре, при которой проводились измерения. Более того, в случае с константами активации ПКА далеко не в любой работе указаны концентрации субстрата и даже фермента, без которых само понятие константы активации теряет смысл.

Тем не менее в этой главе обзора литературы мы предприняли попытку собрать все имеющиеся данные о значениях констант, характеризующих активацию ПКА Iα (таблицы 1.1, 1.2). Также в разделе 1.6.2 мы попытались по возможности обобщить эти данные и привести их к единому виду.

Так как сравнение значений констант, измеренных при разных температурах, невозможно, возникает необходимость в приведении всех значений к одной температуре. В качестве такой температуры удобно выбрать 300 K (численное приближение для понятия «комнатная температура»), при которой было получено большинство констант активации и константа Михаэлиса. Если авторы работ не приводили никаких данных, кроме измеренной константы и температуры T, при которой проводились измерения, мы в первом грубом приближении считали, что $K_{D_{T=300}} \approx K_{D_T}$. Нестрогость этого приближения в какой-то мере оправдывается тем, что в настоящей работе предпринята первая попытка анализа всей

совокупности значений констант, а также тем, что без сделанных приближений было бы невозможно построение численной модели активации ПКА Iα, приведенной в разделе 3.5.4 настоящей диссертации.

Таблица 1.1 – Константы равновесия и скоростей реакций, характеризующие процессы, протекающие при активации протеинкиназы А Iα[7]

Белок лиганд	T, K	Kd, M	K_{ass}, $M^{-1}c^{-1}$	K_{diss},c^{-1}	T = 300 K			Ссылка
					Kd, M	K_{ass}, $M^{-1}c^{-1}$	K_{diss}, c^{-1}	
Константа диссоциации цАМФ из комплекса RCcAMP. А-домен.								
R_{AB} G323E	298	$2{,}2\cdot10^{-6}$	–	–	$2{,}2\cdot10^{-6}$	–	–	[72]
R_{AB}(1–379) R333K	–	$>1{,}5\cdot10^{-6}$	–	–	$>1{,}5\cdot10^{-6}$	–	–	[69]
R_A (1-259)	295*	$1{,}1\cdot10^{-6}$			$1{,}1\cdot10^{-6}$			[68]
Константа диссоциации цАМФ из комплекса RCcAMP. В-домен								
R_{AB} G199E	298	$4{,}0\cdot10^{-7}$	–	–	$4{,}0\cdot10^{-7}$	–	–	[72]
R_{AB}(1–379) R209K	–	$8{,}07\cdot10^{-7}$	–	–	$8{,}07\cdot10^{-7}$	–	–	[69]
Константа диссоциации цАМФ из комплекса RCcAMP. Оба домена								
R_{AB}	298	$2{,}9\cdot10^{-6}$	–	–	$2{,}9\cdot10^{-6}$	–	–	[72]
R_{AB}(1–379)	–	$1{,}66\cdot10^{-7}$	–	–	–	–	–	[69]
R_{AB}(1–379)	295*	$2{,}00\cdot10^{-7}$	–	–	$2{,}00\cdot10^{-7}$	–	–	[68]
R_{AB}	277*	$5{,}0\cdot10^{-8}$	–	–	$5{,}0\cdot10^{-8}$	–	–	[49]
Константа диссоциации лиганда из комплекса RcAMP. А-домен								
R_{AB} G323E цАМФ	*298*	*$2{,}9\cdot10^{-9}$*	–	–	*$2{,}9\cdot10^{-9}$*	–	–	*[72]*
R_{AB}(1–379) R333K	–	$1{,}49\cdot10^{-7}$	–	–	$1{,}49\cdot10^{-7}$	–	–	[69]
R_A(1–259)	295*	$1{,}1\cdot10^{-7}$	–	–	$1{,}1\cdot10^{-7}$	–	–	[68]
R_A(93–259)	295*	$1{,}1\cdot10^{-7}$	–	–	$1{,}1\cdot10^{-7}$	–	–	[68]
R_{AB}(1–379) цАМФ	–	$3{,}5\cdot10^{-8}$	–	–	$3{,}5\cdot10^{-8}$	–	–	[69]
R_{AB}(1–379) цАМФ	303*	$6{,}0\cdot10^{-8}$			$6{,}0\cdot10^{-8}$			[79]
R_{AB}(92–379) цАМФ	303*	$5{,}0\cdot10^{-8}$			$5{,}0\cdot10^{-8}$			[79]

[7] Пояснения к таблице 1.1: * – в тексте статьи названа температура, при которой проводились измерения. В случаях, когда температура в статье не была приведена, но о ней можно было догадаться по аналогичным работам этих же групп авторов, температура также приведена в таблице, но без соответствующего символа. † – в тексте статьи приведены данные об изменениях энтальпии и энтропии в ходе реакции, что дает возможность точно рассчитать значения констант при температуре 300K. ‡ – комнатная температура, которая, в соответствии с распространенным приближением, здесь и далее принята за 300 K. Все константы приведены без ошибок, даже если таковые указаны у авторов. Курсивом выделены строчки, в которых приведены значения, на наш взгляд, выпадающие из основной массы данных или не согласующиеся с нашей моделью, приведенной в разделе 3.5.4 и потому не учитывающиеся при получении средних значений констант.

Продолжение таблицы 1.1

R_A(92–260) цАМФ	293*†	$3{,}8\cdot10^{-8}$	–	–	$5{,}66\cdot10^{-8}$	–	–	[73]
R_A(92–260) 6-АН-цАМФ	293*†	$3{,}8\cdot10^{-8}$	$1{,}15\cdot10^{6}$	$4{,}15\cdot10^{-2}$	$5{,}5\cdot10^{-8}$	$1{,}6\cdot10^{6}$	$9{,}0\cdot10^{-2}$	[73]
R_A(92–260) 8-АНА-цАМФ	293*†	$1{,}10\cdot10^{-7}$	$7{,}04\cdot10^{5}$	$8{,}18\cdot10^{-2}$	$2{,}05\cdot10^{-7}$	$1{,}06\cdot10^{6}$	$2{,}17\cdot10^{-1}$	[73]
R_A(91–244) FM-R239C	295*	–	$3{,}1\cdot10^{6}$	–	–	$3{,}1\cdot10^{6}$	–	[42]
Константа диссоциации цАМФ из комплекса RcAMP. B-домен.								
R_{AB} G199E	*298*	*$0{,}9\cdot10^{-9}$*	–	–	*$0{,}9\cdot10^{-9}$*	–	–	*[72]*
R_{AB}(1–379)	–	*$1{,}5\cdot10^{-8}$*	–	–	*$1{,}5\cdot10^{-8}$*	–	–	*[69]*
R_{AB}(1–379) *R209K*	–	*$1{,}30\cdot10^{-7}$*	–	–	*$1{,}30\cdot10^{-7}$*	–	–	*[69]*
R_{AB}(1–379) *цАМФ*	*303**	*$1{,}5\cdot10^{-8}$*			*$1{,}5\cdot10^{-8}$*			*[79]*
R_{AB}(92–379) *цАМФ*	*303**	*$5{,}0\cdot10^{-8}$*			*$5{,}0\cdot10^{-8}$*			*[79]*
Константа диссоциации цАМФ из комплекса RcAMP. Оба домена.								
R_{AB}	*298*	*$1{,}3\cdot10^{-9}$*	–	–	*$1{,}3\cdot10^{-9}$*	–	–	*[72]*
R_{AB}(1–379)	295*	$1{,}7\cdot10^{-8}$	–	–	$1{,}7\cdot10^{-8}$	–	–	[68]
R_{AB}	293*	$1{,}7\cdot10^{-8}$	–	–	$1{,}7\cdot10^{-8}$	–	–	[74]
R_{AB}	277*	$1{,}5\cdot10^{-8}$	–	–	$1{,}5\cdot10^{-8}$	–	–	[49]
R_{AB}(1–379)	–	$2{,}2\cdot10^{-8}$	–	–	$2{,}2\cdot10^{-8}$	–	–	[69]
Константа диссоциации комплекса R_AC.								
R_A(1–260) *WT*	*296*	*$2{,}6\cdot10^{-9}$*	*$6{,}9\cdot10^{5}$*	*$1{,}8\cdot10^{-3}$*	*$2{,}6\cdot10^{-9}$*	*$6{,}9\cdot10^{5}$*	*$1{,}8\cdot10^{-3}$*	*[69]*
R_A(91–244) FM-R92C	295*	$0{,}19\cdot10^{-9}$	$2{,}0\cdot10^{7}$	$3{,}8\cdot10^{-3}$	$0{,}19\cdot10^{-9}$	$2{,}0\cdot10^{7}$	$3{,}8\cdot10^{-3}$	[65]
R_A(91–244) FM-R92C	295*	$0{,}15\cdot10^{-9}$	$2{,}4\cdot10^{7}$	$3{,}7\cdot10^{-3}$	$0{,}15\cdot10^{-9}$	$2{,}4\cdot10^{7}$	$3{,}7\cdot10^{-3}$	[42]
R_A(91–244) FM-R239C	295*	$0{,}28\cdot10^{-9}$	$2{,}5\cdot10^{7}$	$6{,}9\cdot10^{-3}$	$0{,}28\cdot10^{-9}$	$2{,}5\cdot10^{7}$	$6{,}9\cdot10^{-3}$	[42]
R_A(91–244) WT	–	$0{,}19\cdot10^{-9}$	$7{,}2\cdot10^{7}$	$1{,}3\cdot10^{-2}$	$0{,}19\cdot10^{-9}$	$7{,}2\cdot10^{7}$	$1{,}3\cdot10^{-2}$	[75]
R_A(91–244) WT	296	$0{,}18\cdot10^{-9}$	$1{,}5\cdot10^{7}$	$2{,}7\cdot10^{-3}$	$0{,}18\cdot10^{-9}$	$1{,}5\cdot10^{7}$	$2{,}7\cdot10^{-3}$	[32]
R_A(91–244) R226A	296	$0{,}54\cdot10^{-9}$	$1{,}7\cdot10^{7}$	$9{,}1\cdot10^{-3}$	$0{,}54\cdot10^{-9}$	$1{,}7\cdot10^{7}$	$9{,}1\cdot10^{-3}$	[32]
R_A(91–244) L233A	296	$0{,}70\cdot10^{-9}$	$8{,}7\cdot10^{6}$	$6{,}1\cdot10^{-3}$	$0{,}70\cdot10^{-9}$	$8{,}7\cdot10^{6}$	$6{,}1\cdot10^{-3}$	[32]
R_A(91–244) M234A	296	$1{,}09\cdot10^{-9}$	$7{,}5\cdot10^{6}$	$8{,}2\cdot10^{-3}$	$1{,}09\cdot10^{-9}$	$7{,}5\cdot10^{6}$	$8{,}2\cdot10^{-3}$	[32]

Окончание таблицы 1.1

Константа диссоциации комплекса $R_{AB}C$								
R_{AB}(1–379) WT	296	$0{,}19\cdot10^{-9}$	$0{,}12\cdot10^{6}$	$2{,}3\cdot10^{-5}$	$0{,}19\cdot10^{-9}$	$0{,}12\cdot10^{6}$	$2{,}3\cdot10^{-5}$	[69]
R_{AB}(1–379) WT	296*	$0{,}1\cdot10^{-9}$	$0{,}81\cdot10^{6}$	$8{,}0\cdot10^{-5}$	$0{,}1\cdot10^{-9}$	$0{,}81\cdot10^{6}$	$8{,}0\cdot10^{-5}$	[35]
R_{AB}(91–379) WT	*296*	*$0{,}41\cdot10^{-9}$*	*$0{,}8\cdot10^{6}$*	*$3{,}0\cdot10^{-4}$*	*$0{,}41\cdot10^{-9}$*	*$0{,}8\cdot10^{6}$*	*$3{,}0\cdot10^{-4}$*	*[32]*
R_{AB}(91–379) R226A	296	$0{,}72\cdot10^{-9}$	$1{,}8\cdot10^{6}$	$1{,}3\cdot10^{-3}$	$0{,}72\cdot10^{-9}$	$1{,}8\cdot10^{6}$	$1{,}3\cdot10^{-3}$	[32]
R_{AB}(91–379) L233A	296	$1{,}28\cdot10^{-9}$	$0{,}8\cdot10^{6}$	$1{,}0\cdot10^{-3}$	$1{,}28\cdot10^{-9}$	$0{,}8\cdot10^{6}$	$1{,}0\cdot10^{-3}$	[32]
R_{AB}(91–379) M234A	296	$1{,}08\cdot10^{-9}$	$1{,}2\cdot10^{6}$	$1{,}3\cdot10^{-3}$	$1{,}08\cdot10^{-9}$	$1{,}2\cdot10^{6}$	$1{,}3\cdot10^{-3}$	[32]
R_{AB}(1–379) R333K	*296*	*$0{,}15\cdot10^{-9}$*	*$1{,}9\cdot10^{6}$*	*$2{,}9\cdot10^{-4}$*	*$0{,}15\cdot10^{-9}$*	*$1{,}9\cdot10^{6}$*	*$2{,}9\cdot10^{-4}$*	*[69]*
R_{AB}(92–379) R333K	296	$0{,}89\cdot10^{-10}$	$1{,}9\cdot10^{6}$	$1{,}7\cdot10^{-4}$	$0{,}89\cdot10^{-10}$	$1{,}9\cdot10^{6}$	$1{,}7\cdot10^{-4}$	[69]
R_{AB} R333K	296*	$0{,}2\cdot10^{-10}$	$1{,}12\cdot10^{6}$	$2{,}2\cdot10^{-5}$	$0{,}2\cdot10^{-10}$	$1{,}12\cdot10^{6}$	$2{,}2\cdot10^{-5}$	[76]
R_{AB}(1–379) R209K	296	$0{,}36\cdot10^{-10}$	$1{,}4\cdot10^{6}$	$5{,}1\cdot10^{-5}$	$0{,}36\cdot10^{-10}$	$1{,}4\cdot10^{6}$	$5{,}1\cdot10^{-5}$	[69]
Константа диссоциации комплекса $R_{A\ 91\text{-}244}$ C. A-домен занят цАМФ								
R_A FM-R92C	295*	$3{,}2\cdot10^{-8}$	$1{,}7\cdot10^{7}$	0,55	$3{,}2\cdot10^{-8}$	$1{,}7\cdot10^{7}$	0,55	[65]
R_A FM-R92C	295*	$1{,}3\cdot10^{-7}$	$2{,}0\cdot10^{7}$	2,6	$1{,}3\cdot10^{-7}$	$2{,}0\cdot10^{7}$	2,6	[42]
Константа диссоциации комплекса $R_{A\ 91\text{-}244}$ C. A-домен занят Sp-цАМФ								
R_A FM-R92C	295*	$4{,}0\cdot10^{-8}$	$1{,}9\cdot10^{7}$	0,75	$4{,}0\cdot10^{-8}$	$1{,}9\cdot10^{7}$	0,75	[65]
Константа диссоциации комплекса $R_{A\ 91\text{-}244}$ C. A-домен занят Rp-цАМФ								
R_A FM-R92C	295*	$4{,}0\cdot10^{-11}$	$1{,}9\cdot10^{7}$	$7{,}5\cdot10^{-4}$	$4{,}0\cdot10^{-11}$	$1{,}9\cdot10^{7}$	$7{,}5\cdot10^{-4}$	[65]
Константа диссоциации комплекса R_{AB}C. A-домен занят цАМФ								
R_{AB} WT	*298*	*~$1{,}0\cdot10^{-9}$*	–	–	*~$1{,}0\cdot10^{-9}$*	–	–	*[72]*
Константа диссоциации комплекса R_{AB}C. B-домен занят цАМФ								
R_{AB} WT	298	~$1{,}0\cdot10^{-9}$	–	–	~$1{,}0\cdot10^{-9}$	–	–	[72]
R_{AB} WT	296	$1{,}1\cdot10^{-8}$	–	–	$1{,}1\cdot10^{-8}$	–	–	[69]
Константа диссоциации комплекса R_{AB}C. Оба домена заняты цАМФ								
R_{AB} WT	298	$2{,}5\cdot10^{-7}$	–	–	$2{,}5\cdot10^{-7}$	–	–	[72]
R_{AB} WT	298*	$2{,}4\cdot10^{-7}$	–	–	$2{,}4\cdot10^{-7}$	–	–	[43]
R_{AB} WT	*298**	*$1{,}6\cdot10^{-7}$*	–	–	*$1{,}6\cdot10^{-7}$*	–	–	*[43]*
R_{AB} WT	298*	$2{,}5\cdot10^{-7}$	–	–	$2{,}5\cdot10^{-7}$	–	–	[43]
Константа Михаэлиса для кемптида								
C WT	к.т.*‡	$1{,}6\cdot10^{-5}$	–	–	~$1{,}6\cdot10^{-5}$	–	–	[67]

Таблица 1.2 – Константы активации протеинкиназы А Iα

Белок	T,K	Какт,М	Концентрация RC комплекса,М	Концентрация кемптида,М	Ссылка
Константа активации комплекса $R_{AB}C$.					
R_{AB}(1–379) WT	к.т.	$1{,}01\cdot10^{-7}$	$2{,}0\cdot10^{-8}$	$1{,}0\cdot10^{-4}$	[69]
R_{AB}(1–379) WT	295	$2{,}00\cdot10^{-7}$	$2{,}0\cdot10^{-8}$		[68]
R_{AB}(1–379) WT	к.т.	$1{,}44\cdot10^{-7}$	–	–	[67]
R_{AB}(1–379) WT	к.т.	$0{,}88\cdot10^{-7}$	$3{,}0\cdot10^{-8}$	–	[35]
R_{AB} WT	к.т.	$1{,}63\cdot10^{-7}$	$3{,}0\cdot10^{-8}$	–	[76]
R_{AB}(91–379) WT	–	$0{,}80\cdot10^{-7}$	$2{,}5\cdot10^{-8}$	$1{,}0\cdot10^{-4}$	[32]
R_{AB}(91–379) R226A	–	$0{,}84\cdot10^{-7}$	$2{,}5\cdot10^{-8}$	$1{,}0\cdot10^{-4}$	[32]
R_{AB}(91–379) L233A	–	$0{,}26\cdot10^{-7}$	$2{,}5\cdot10^{-8}$	$1{,}0\cdot10^{-4}$	[32]
R_{AB}(91–379) M234A	–	$0{,}38\cdot10^{-7}$	$2{,}5\cdot10^{-8}$	$1{,}0\cdot10^{-4}$	[32]
R_{AB}(1–379) R333K	к.т	$1{,}4\cdot10^{-6}$	$2{,}0\cdot10^{-8}$	$1{,}0\cdot10^{-4}$	[69]
R_{AB}(1–379) R209K	к.т	$1{,}7\cdot10^{-6}$	$2{,}0\cdot10^{-8}$	$1{,}0\cdot10^{-4}$	[69]
R_{AB}(92–379) R333K	к.т	$1{,}8\cdot10^{-6}$	$2{,}0\cdot10^{-8}$	$1{,}0\cdot10^{-4}$	[69]
R_{AB}(1–379) R209K R333K	к.т	$2{,}2\cdot10^{-6}$	$2{,}0\cdot10^{-8}$	$1{,}0\cdot10^{-4}$	[69]
Константа активации комплекса R_AC.					
R_A(94–235)	к.т.	$2{,}25\cdot10^{-7}$	–	–	[67]
R_A(1–259)	295	$1{,}1\cdot10^{-6}$	$2{,}0\cdot10^{-8}$	–	[68]
R_A(93–259)	295	$1{,}1\cdot10^{-6}$	$2{,}0\cdot10^{-8}$	–	[68]
R_A(91–244) WT	–	$0{,}9\cdot10^{-6}$	$3{,}0\cdot10^{-8}$	$1{,}0\cdot10^{-4}$	[44]
R_A(91–244) WT	277	$7{,}63\cdot10^{-7}$	–	–	[67]
R_A(91–244) WT	–	$1{,}0\cdot10^{-6}$	$2{,}5\cdot10^{-8}$	$1{,}0\cdot10^{-4}$	[32]
R_A(91–244) R226A	–	$5{,}4\cdot10^{-8}$	$2{,}5\cdot10^{-8}$	$1{,}0\cdot10^{-4}$	[32]
R_A(91–244) L233A	–	$2{,}0\cdot10^{-8}$	$2{,}5\cdot10^{-8}$	$1{,}0\cdot10^{-4}$	[32]
R_A(91–244) M234A	–	$2{,}8\cdot10^{-8}$	$2{,}5\cdot10^{-8}$	$1{,}0\cdot10^{-4}$	[32]
R_A(91–244) R241A	–	$9{,}1\cdot10^{-6}$	$3{,}0\cdot10^{-8}$	$1{,}0\cdot10^{-4}$	[44]
R_A(91–244) L203A	–	$0{,}8\cdot10^{-6}$	$3{,}0\cdot10^{-8}$	$1{,}0\cdot10^{-4}$	[44]
R_A(91–244) I204A	–	$2{,}4\cdot10^{-6}$	$3{,}0\cdot10^{-8}$	$1{,}0\cdot10^{-4}$	[44]
R_A(91–244) Y229A	–	$0{,}66\cdot10^{-6}$	$3{,}0\cdot10^{-8}$	$1{,}0\cdot10^{-4}$	[44]

1.6.2. Обсуждение приведенных значений констант, характеризующих активацию ПКА Iα

1.6.2.1. Константы диссоциации RC комплекса на свободные R- и C-субъединицы

Согласно существующим данным [77, 78], диссоциация R- и C-субъединиц в присутствии цАМФ происходит в две стадии. На первой из них, вследствие перехода R-субъединицы в B-конформацию, формируется комплекс, в котором R- и C-субъединицы связаны предположительно только взаимодействием между псевдосубстратной последовательностью и каталитическим сайтом. На второй стадии этот комплекс диссоциирует, высвобождая активные C-субъединицы. Для диссоциации R- и C-субъединиц в отсутствие цАМФ двухстадийного процесса не показано.

Исходя из такой последовательности событий, константы диссоциации $R_{AB}C$ и R_AC комплексов в отсутствие цАМФ и в случае, если один или оба цАМФ-связывающих сайта заняты лигандом, должны существенно различаться. Приведенные в таблице 1.1

экспериментальные данные подтверждают это предположение.

Среднее значение константы диссоциации R_AC комплекса в отсутствие цАМФ составляет $0{,}2\cdot10^{-9}$ М (усреднение по данным из таблицы 1.1), если не принимать в расчет на порядок большее значение $2{,}6\cdot10^{-9}$М, полученное в работе [69]. Мутации остатков B-спирали A-домена R226A, L233A и M234A уменьшают стабильность R_AC комплекса [32], что дает основание говорить о роли этих остатков в обеспечении взаимодействия B/C-спирали A-домена с C-субъединицей. Названные мутации делают R_AC комплекс похожим на $R_{AB}C$ комплекс с цАМФ-связанным B-доменом. Авторы статьи отмечают, что схожесть заключается не только в близости значений констант, но и в структурных чертах обоих белков. B-домен сам по себе слабо связан с C-субъединицей и может находиться как B-, так и H-конформации. Связывание цАМФ в сайте B-домена, очевидно, смещает равновесие в сторону B-конформации, и, как результат, уменьшает взаимодействие между B/C-спиралью A-домена с C-субъединицей. Этот же эффект достигается внедрением мутаций R226A, L233A и M234A.

Среднее значение константы диссоциации $R_{AB}C$ комплекса в отсутствие цАМФ составляет $0{,}15\cdot10^{-9}$М (таблица 1.1), если не учитывать значение, приведенное в работе [32] ($0{,}41\cdot10^{-9}$М). Таким образом, количественные данные подтверждают гипотезу, согласно которой появление B-домена в эволюции приводит лишь к незначительному увеличению стабильности RC комплекса, но при этом дает возможность более гибкой регуляции активации ПКА. В соответствии с литературными данными, мутации R226A, L233A и M234A ослабляют комплекс $R_{AB}C$ [32], а мутации R333K и R209K – наоборот делают его более прочными [69, 76]. Последний факт представляет особый интерес, так как ни R209, ни R333 не участвуют во взаимодействии R- и C-субъединиц. Для $R_{AB}C$ R209K комплекса константу диссоциации можно принять приближенно равной $0{,}4\cdot10^{-10}$М, а для $R_{AB}C$ R333K комплекса среднее значение константы диссоциации равно $0{,}6\cdot10^{-10}$М.

В присутствии цАМФ значение константы диссоциации R_AC комплекса возрастает (таблица 1.1), что хорошо согласуется с вышеизложенной моделью цАМФ-зависимой активации ПКА. Из-за большого разброса значений соответствующей константы диссоциации мы в первом приближении усреднили значения из таблицы 1.1, относящиеся как к R_ACcAMP, так и к R_ACSp-cAMPS комплексам. В результате среднее значение константы диссоциации R_ACcAMP и R_ACSp-cAMPS комплексов оказалось приближенно равным $6{,}7\cdot10^{-8}$М. Тем не менее как продемонстрировано нами в приложении A, такая оценка может использоваться только в качестве очень грубого приближения.

Как следует из экспериментальных данных, приведенных в таблице 1.1, константа диссоциации R_AC комплекса в присутствии Rp-цАМФS равняется $4{,}0\cdot10^{-11}$М, что не только меньше константы диссоциации данного комплекса в присутствии агонистов (цАМФ и Sp-

цАМФS), но также меньше константы спонтанной диссоциации R_AC комплекса ($0{,}2\cdot10^{-9}$ М). Таким образом, принятое в литературе обозначение Rp-цАМФS как обратного агониста (а не антагониста) ПКА Iα, является корректным.

Константа диссоциации $R_{AB}C$ комплекса, оба домена которого заняты цАМФ, существенно выше константы спонтанной диссоциации ($0{,}15\cdot10^{-9}$М). Среднее ее значение составляет $2{,}5\cdot10^{-7}$М (Таюлица 1.1), если не учитывать выпадающее из общего ряда данных значение $1{,}6\cdot10^{-7}$М, полученное в работе [43]. Согласно имеющимся в литературе данным, $R_{AB}C$ комплекс, связанный с двумя молекулами цАМФ, не может быть далее активирован и распадается на свободные R- и C-субъединицы в соответствии с законом действующих масс. Очевидно, что интенсивность этого процесса повышается в присутствии субстрата, конкурирующего за каталитический сайт C-субъединицы.

Среднее значение константы диссоциации $R_{AB}C$ комплекса, B-домен которого занят цАМФ, в первом приближении можно принять равным $6{,}0\cdot10^{-9}$М (таблица 1.1). Таким образом, $R_{AB}C$ комплекс с цАМФ-связанным B-доменом оказывается лишь немного слабее R_AC комплексов с мутационными заменами R226A, L233A и M234A. Это соотношение между стабильностями названных комплексов полностью соответствует теоретическим представлениям об их строении (см. выше), а потому принятое приближение представляется разумным.

Данные о значении константы диссоциации $R_{AB}C$ комплекса, A-домен которого занят цАМФ, представляются нам недостоверными. Авторы работы [72], опубликовавшие единственное приведенное в таблице 1.1 значение ($\sim1{,}0\cdot10^{-9}$М), приводят его мимоходом без указания на метод и говорят о том, что значение получено приближенно. В то же время, если следовать логическим предположениям, константа диссоциации такого комплекса должна мало отличаться от константы диссоциации комплекса R_AC в присутствии цАМФ, а следовательно должна быть порядка $6{,}0\cdot10^{-8}$М.

1.6.2.2. Константы диссоциации цАМФ из цАМФ-связывающих сайтов R-субъединицы

Значения константы диссоциации цАМФ из цАМФ-связывающих сайтов R-субъединицы зависят от того, входит ли R-субъединица в состав RC комплекса или находится в свободном состоянии.

Существует очень небольшое количество работ, в которых проводились измерения константы диссоциации цАМФ из связывающих сайтов RC комплекса. При этом только в одной из них [72] измерения велись в присутствии избытка C-субъединиц, препятствующих по закону действующих масс окончательной диссоциации R- и C-субъединиц. С другой стороны, мутационные замены, используемые в этой работе [72] для инактивации неисследуемого сайта

(G323E и G199E), не изучены хорошо на предмет стопроцентной гарантии инактивации. Таким образом, достоверных данных о значениях констант диссоциации цАМФ из связывающих сайтов RC комплекса, на настоящий момент не существует.

Тем не менее в качестве первого приближения мы усреднили приведенные в таблице 1.1 данные и получили значения $>1{,}5\cdot10^{-6}$M и $6{,}0\cdot10^{-7}$M для констант диссоциации цАМФ из A- и B-доменов соответственно. Стоит отметить, что как бы ни была велика ошибка этой оценки, значение для B-домена все же должно быть ближе к истине, чем для A-домена. Судя по многочисленным экспериментальным данным, A-домен в составе RC комплекса связывает цАМФ гораздо слабее, чем B-домен, и, следовательно, пренебрегая этим связыванием, мы вносим гораздо меньшую погрешность в константу для B-домена, чем если будем пренебрегать связыванием цАМФ с B-доменом и измерять константу для A-домена.

Значение константы диссоциации цАМФ из A-домена свободной R-субъединицы зависит от того, может ли остаток W260 образовать стэкинг-взаимодействие с ароматическим кольцом лиганда. Делеционные мутанты R-субъединицы R(93–259) и R(1–259) лишены этого остатка. Точечный мутант R_{AB}(1–379) R333K остатком W260 обладает, однако не может правильно его ориентировать в пространстве, так как для этого необходим цАМФ, связанный в B-домене[8]. В результате все три мутанта связывают цАМФ достаточно слабо: средняя константа диссоциации цАМФ (таблица 1.1) равна $1{,}2\cdot10^{-7}$M. Присутствие остатка W260 и возможность его правильно ориентировать в пространстве уменьшают константу диссоциации цАМФ из A-домена свободной R-субъединицы. В таком случае ее значение можно принять равным $5{,}6\cdot10^{-8}$M (таблица 1.1).

Ввиду большого разброса данных мы не стали усреднять значения константы диссоциации цАМФ из B-домена свободной R-субъединицы. Конкретное значение константы, справедливое хотя бы в качестве первого приближения, на данный момент остается не определенным.

Как будет продемонстрировано в приложении Б (раздел Б.2.1), оценка средних значений констант диссоциации цАМФ, характеризующих связывание цАМФ с обоими доменами, представляется спорной как для RC комплекса, так и для свободной R-субъединицы. Исходя из этого, мы не рассматривали соответствующие экспериментальные данные и не использовали их при анализе наших результатов.

---

[8] Правильней рассматривать мутантную субъединицу R_{AB}(1–379) R333K, как имеющую среднее сродство к цАМФ среди субъединиц, создающих и не создающих правильную ориентацию ароматического кольца W260. Однако в связи с ограниченными экспериментальными данными мы в первом приближении усреднили значения константы для трех названных комплексов. В перспективе для более точных оценок необходима корректировка сделанных приближений.

1.6.2.3. Константы активации RC комплекса

Определение средних значений констант активации RC комплексов представляет собой достаточно сложную задачу, несмотря на обилие экспериментальных данных (таблица 1.2). Дело в том, что все измерения проводились при разных концентрациях белка и субстрата, а иногда и при разных температурах, причем часто авторы не указывают все условия проводимого опыта, вынуждая таким образом последующих исследователей отказываться от использования их данных. Тем не менее мы решили использовать все имеющиеся экспериментальные данные, беря, однако, вместо среднего значения константы диапазон значений. Так, для комплекса $R_{AB}C$ WT искомый диапазон покрывает значения от $0{,}8\cdot10^{-7}$М до $2{,}0\cdot10^{-7}$М. Для комплекса R_AC WT истинное значение константы активации лежит в пределах от $7{,}6\cdot10^{-7}$М до $1{,}1\cdot10^{-6}$М. Мутантный комплекс R_{AB}(1–379):C R333K характеризуется значением константы активации от $1{,}4\cdot10^{-6}$М до $1{,}8\cdot10^{-6}$М. А для комплексов R_{AB}(1–379):C R209K и R_A(91–244):C M234A в литературных источниках можно найти только по одному измерению – соответствующие константы активации равны $1{,}7\cdot10^{-6}$М и $2{,}8\cdot10^{-8}$М.

Важный параметр, позволяющий использовать значения констант активации в теоретических построениях, – константа Михаэлиса. В таблице 1.1 приведено значение константы Михаэлиса для кемптида – наиболее часто используемого в экспериментах субстрата ПКА Iα. Исходя из экспериментальных данных, оно составляет $1{,}6\cdot10^{-5}$М.

1.7. Связь настоящего исследования с литературными данными

Обобщая все вышеизложенные данные, можно сказать, что RIα – самостоятельный белок, самой изученной функцией которого является регуляция каталитической активности протеинкиназы А. Однако на этом его роль в клетке не ограничивается. И очень возможно, что весь спектр белков, в работе которых тем или иным образом участвует RIα, пока не определен. Все домены RIα важны для ее функционирования. Но только два из них (цАМФ-связывающие домены А и В) способны существовать в виде двух дискретных конформаций (Н и В), имеющих разное сродство к ряду белков и низкомолекулярных соединений. Переходу А- и В-доменов между конформациями отводится ключевая роль в осуществлении RIα регуляции активности взаимодействующих с ней белков. цАМФ и ряд других циклических нуклеотидов ускоряют Н→В переход цАМФ-связывающих доменов. В то же время факторов, ускоряющих обратный (В→Н) переход пока не обнаружено. Помимо RIα, цАМФ-связывающие домены входят в состав других изоформ ПКА и ПКГ, транскрипционных факторов прокариот, HCN и CNG каналов, белка EPAC и, возможно, других белков. Функционирование всех этих белков также определяется переходами цАМФсвязывающих доменов между Н- и В-конформациями.

В свете перечисленных фактов становится очевидна необходимость понимания механизма конформационных изменений цАМФ-связывающих доменов. Для разрешения этого вопроса сделано уже многое, но, тем не менее, не все. Так, предложено, что в передаче информации о связывании лиганда на удаленные от него структуры белка участвуют два «переключателя». В модели электростатического «переключателя» R209–D170–R226 придается значение электростатическим взаимодействиям между отрицательно заряженным лигандом и цАМФ-связывающим сайтом, имеющим на своей поверхности области положительного потенциала. Одному из остатков (R209), участвующему в создании положительного потенциала сайта и взаимодействующему напрямую с лигандом, отводится при этом ключевая роль в запуске конформационных изменений всего домена. К существенным недостаткам модели электростатического «переключателя» можно отнести ее несоответствие некоторым экспериментальным данным и отсутствие прямого доказательства, ее подтверждающего. Модель гидрофобного «переключателя» L203–Y229, напротив, описывает доказанную экспериментально связь между конформационными изменениями ФСК и B-спирали. Однако механизм, посредством которого связывание лиганда приводит к изменениям ФСК, остается в рамках этой модели вне рассмотрения.

Наше исследование направлено на устранение выявленных пробелов в понимании функционирования цАМФ-связывающих доменов. С использованием молекулярно-динамического моделирования мы оценили значение электростатического и гидрофобного «переключателей» в поддержании стабильности H- и B-конформаций и в обеспечении перехода между ними. Также, мы предложили свою модель электростатического «переключателя», передающего информацию о связывании лиганда на гидрофобный «переключатель». И в завершение, мы охарактеризовали наиболее вероятную последовательность событий, лежащую в основе H→B конформационного перехода A-домена RIα. Построение профиля свободной энергии вдоль этой последовательности, которое планируется нами в дальнейшем, позволит перейти к объяснению взаимодействия RIα с C-субъединицей и другими белками.

2. МЕТОДЫ

2.1. Докинг лигандов в цАМФ-связывающие сайты А- и В-домена RIα

Докинг цАМФ, Rp-цАМФS и Sp-цАМФS в цАМФ-связывающий сайт В-домена и цАМФ в сайт А-домена проводился с помощью программы Quantum 3.3.0 в соответствии со стандартной методикой, предложенной разработчиками программы [80]. Данная программа осуществляет докинг гибкого лиганда в жесткий белок, а затем минимизирует энергию получившегося комплекса.

Пространственные структуры В-домена RIα (а. о. 235 – 376) в В- и Н-конформациях были взяты из базы данных PDB под номерами 1NE6 (Sp-цАМФS -связанная RIα(109–376)) [27] и 2QCS (комплекс RIα(91–379):C) [4] соответственно. Как уже упоминалось в разделе 1.4, В-домен в составе структуры 2QCS несет мутацию R333K, ослабляющую взаимодействие лиганда с цАМФ-связывающим сайтом. Для того чтобы использовать В-домен из этой структуры в наших исследованиях, мы произвели обратную замену остатка K333. При этом был выбран конформер R333, характерный для гомологичного остатка R209 из А-домена.

А-домен (а. о. 118 – 242) в В-конформации, как и В-домен, был взят из лигандсвязанной структуры 1NE6. Н-конформация А-домена на момент проведения докинга (2008–2009 гг.) была представлена в двух структурах: 2QCS (RIα(91–379):C) [4] и 3FHI (RIα(91–244):C) [28]. Мы выбрали последнюю из них, как обладающую наименьшими размерами, а поэтому более удобную в расчетах.

Так как ФСК А-домена образует ряд контактов с С-субъединицей, докинг цАМФ в А-домен, находящийся в Н-конформации, предполагает обязательный учет фрагментов С-субъединицы, контактирующих с цАМФ-связывающим сайтом. Следуя этому требованию, мы не рассматривали А-домен в Н-конформации отдельно от С-субъединицы, а использовали на первой стадии докинга RIα(91–244):C комплекс. На второй стадии докинга, представляющей собой минимизацию энергии лигандсвязанного домена, мы оставили от С-субъединицы только фрагмент (а. о. 237 – 254), взаимодействующий непосредственно с цАМФ-связывающим сайтом. Это упрощение позволяет существенно сократить время расчета, но в то же время не отражается на значении численной характеристики взаимодействия лиганда с белком (ΔG^o).

2.2. Квантово-химический анализ параметров водородных связей, образуемых экваториальным атомом кислорода (серы) лиганда и амидной группой белка

Объяснение механизма действия Rp-цАМФS как обратного агониста ПКА Iα является ключом к пониманию конформационных изменений ФСК. Важным шагом в его определении стала оценка длин и энергий водородных связей, образуемых экваториальным атомом

кислорода (серы) лиганда и амидной группой белка.

Особенности водородной связи между цАМФ и амидной группой белка исследовались с помощью модельных соединений формилметиламина (модель амидной группы белка) и триметилфосфата (модель фосфатной группы цАМФ). При анализе связи с участием Rp-цАМФS вместо триметилфосфата использовался триметилфосфотиоат.

Минимизация энергии исследуемых связей выполнялась с использованием пакета квантово-химических программ Gaussian`03 [81] методом Хартри–Фока–Рутаана [82] в базисе 6-31+G(d) [83 – 86] без учета влияния среды, T = 0 K.

2.3. Изучение конформационных переходов β-субдомена A-домена RIα, равновесия между его конформациями и влияния на это равновесие мутационных замен R209

Основные исследования, направленные на решение первых двух из поставленных задач (см. раздел Введение, стр. 8), были проведены на β-субдомене A-домена RIα. Удаление α-субдомена было важно не столько для установления механизма H→B перехода ФСК (эти данные впоследствии были подтверждены и на целом A-домене), сколько для изучения заселенности конформаций β-субдомена, а также влияния на нее мутационных замен R209. Последний вопрос является ключевым для определения роли электростатического «переключателя» R209–D170–R226 и в частности остатка R209 в переходе между H- и B-конформациями. Однако его решение на модели целого A-домена требует больших затрат времени. Использование отдельного β-субдомена позволяет существенно сократить время моделирования, причем это сокращение носит двоякий характер. Во-первых, из-за уменьшения количества атомов в системе уменьшается время расчета одного шага МД, что непосредственно отражается на машинном времени. Во-вторых, в соответствии с нашими предварительными результатами, удаление α-субдомена сокращает реальное (физическое) время конформационных переходов системы, что опять-таки приводит к уменьшению машинного времени.

Тем не менее моделирование отдельного β-субдомена не является общепринятой методикой исследования цАМФ-связывающих доменов. Поэтому ее использование должно быть подкреплено демонстрацией стабильности β-субдомена и обоснованием корректности переноса данных, полученных при его моделировании, на целый цАМФ-связывающий домен. То, что β-субдомен удовлетворяет этим требованиям, было установлено по результатам моделирования. Стабильность β-субдомена косвенно подтверждается отсутствием малейших признаков его денатурации на временных отрезках, используемых в работе, (10 нс). В пользу приемлемости модели β-субдомена для изучения преобразований ФСК соответствующего ему цАМФ-связывающего домена также свидетельствуют и полученные нами данные. Подробное их рассмотрение приведено в разделе 5.3.1.

2.3.1. Подготовка β-субдомена

Пространственные структуры β-субдомена А-домена RIα (A150 – D225) в B- и H-конформациях были взяты из базы данных PDB под номерами 1NE6 и 3PVB [27, 29] соответственно. Последняя имеет преимущество перед двумя другими структурами А-домена в H-конформации (2QCS и 3FHI), так как содержит водородную связь A202(C=O)–G206(N-H), характерную для α-спирали ФСК. Наличие этой связи делает структуру 3PVB среди всего ансамбля H-конформаций наиболее близкой к B-конформации. И действительно, как показали предварительные исследования, использование такой структуры при изучении перехода А-домена из H- в B-конформацию существенно сокращает время расчета.

Для выявления роли электростатического «переключателя» R209–D170–R226 и, в частности, значения остатка R209 в конформационных переходах А-домена были проведены моделирования не только β-субдомена белка дикого типа, но также несущего точечные мутации R209I, R209G, R209E и R209K. Предпосылкой к такому расчету стала работа Р. Стейнберга, свидетельствующая о возможности замены R209 на ряд остатков при сохранении в той или иной степени способности ПКА Iα к цАМФ-индуцированной активации [34]. Все мутации вводились с использованием стандартных возможностей программы NAMD [87].

Исходной системой для постановки МД моделирований в этом разделе диссертации был взят β-субдомен (дикого типа или с мутационными заменами R209), находящийся в H-конформации. B-конформация β-субдомена использовалась только для оценки частоты и степени ее реализации в поставленных экспериментах (раздел 2.3.3). В ряде опытов моделирование проводили в присутствии цАМФ, предварительно поместив его в связывающий сайт исследуемого β-субдомена. Точное положение цАМФ определяли путем выравнивания структуры 3PVB с цАМФ-содержащим комплексом, полученным в ходе докинга (о методике выравнивания подробнее в разделе 2.5.1). Непосредственный докинг лигандов в сайт А-домена структуры 3PVB не был осуществлен в связи с окончанием срока лицензии программы Quantum 3.3.0.

2.3.2. Моделирование конформационного равновесия β-субдомена

Исследование β-субдомена проводилось методом молекулярной динамики (МД) с использованием программы NAMD 2.8 [87]. Белок помещался в прямоугольную ячейку, состоящую из TIP3P молекул воды [88], на границах которой были заданы периодические граничные условия. Начальные скорости атомов системы были получены при помощи распределения Максвелла-Больцмана. В качестве шага интегрирования был взят временной промежуток, равный 2 фс. Межатомные взаимодействия моделировались на основе параметров силового поля CHARMM27 [89, 90]. При этом для упрощения вычисления кулоновской энергии

использовался метод Эвальда (particle-mesh Ewald, PME) [91], а потенциал Леннарда-Джонса, описывающий вандерваальсовы взаимодействия, обрезался с применением сглаживающей функции (switching function), радиус включения сглаживания которой равнялся 10 Å, а радиус обрезания – 12 Å. Следует отметить, что сглаживающая функция с указанными значениями радиусов использовалась и в методе Эвальда. В этом случае с ее помощью определялись границы учета короткодействующей и дальнодействующей составляющей кулоновской энергии.

Все перечисленные выше параметры использовались также для моделирования целого A-домена, методике исследования которого посвящен раздел 2.4.

Энергия подготовленных таким образом систем минимизировалась при помощи 10 000 шагов алгоритма сопряженного градиента. После этого системы нагревались в течение 100 пс до температуры близкой к 310 K, а затем моделировались 10 нс в микроканоническом (NVE) ансамбле. NVE ансамбль был предпочтительней в этом случае NVT и NPT ансамблей, так как процессы, происходящие в ФСК, оказались очень чувствительными к коррекции скоростей атомов, применяемой при контроле температуры.

Для каждой из исследуемых систем было предпринято от 8 до 15 расчетов с суммарным временем 80 – 150 нс. Этого времени в первом приближении было достаточно для получения представления об относительной стабильности конформаций β-субдомена. Результатом выполненных расчетов стали траектории белка (или лиганд-белкового комплекса) в фазовом пространстве[9]. Равновесные участки этих траекторий сшивались в один файл для каждой системы и исследовались методом кластерного анализа в соответствии с методикой, изложенной в разделе 2.3.3.

Согласно существующим данным остаток G169, входящий в состав β2β3-петли, образует CH-π-взаимодействие с гуанидиновой группой R209 [52], что способствует поддержанию определенного изгиба β2β3-петли. Как показали предварительные расчеты, в силовом поле CHARMM27 нет параметров, корректно описывающих это взаимодействие, поэтому β2β3-петля, несмотря на присутствие R209, в течение первой наносекунды моделирования теряет искомый изгиб и переходит в другую конформацию. Во избежание этого нежелательного эффекта положение β2β3-петли в течение всего времени моделирования поддерживалось с помощью внешних сил, которые накладывались на атомы основной цепи β2β3-петли (Q164 – F172) и стабильных участков β-субдомена (а. о. V154 – I163, Y173 – V182, T190 – G195, K214 – I224). Выражение для потенциальной энергии, определяющей накладываемые силы, имело

[9] Здесь и далее будем полагать, что состояние системы зависит только от внутренних координат всех ее атомов, но не зависит от скоростей этих атомов и положения центра масс системы. Таким образом, исследуемое нами фазовое пространство обладает меньшей размерностью, чем фазовое пространство в строгом смысле, и является, по сути, пространством микроконформаций системы.

следующий вид:

$$U(RMSD) = \frac{1}{2} k \cdot RMSD^2 ,$$

где k – константа “жесткости”, в расчете на один атом равная 4 – 5 ккал/(моль·Å^2), а RMSD – среднеквадратичное отклонение текущего положения рассматриваемых атомов от их положения, наблюдаемого при реализации нативного изгиба β2β3-петли.

Из приведенного выражения видно, что наложение сил не только на атомы β2β3-петли, но и на атомы стабильных участков β-субдомена было необходимо для устранения возможности уменьшения RMSD путем перемещения домена как целого.

В системах с мутационной заменой R209K мы использовали эту же методику наложения внешних сил для поддержания положения боковой цепи K209 близко к нативному положению R209. То положение K209, относительно которого рассчитывали RMSD, определялось в ходе моделирования домена без фиксации K209 и выбиралось как наиболее близкое к нативному положению R209 в связывающем сайте. О каждом случае применения такой фиксации K209 сказано отдельно в последующих главах (разделы 5.2.6 и 6).

2.3.3. Математическая обработка результатов методом кластерного анализа

Из сказанного выше следует, что каждая точка МД траектории представляет собой микроконформацию исследуемой системы. Если при этом время моделирования настолько велико, что количество точек-микроконформаций, реализовавшихся для каждого из метастабильных состояний системы, пропорционально устойчивости этих состояний, то к совокупности полученных микроконформаций можно применить кластерный анализ. Выявленные кластеры в общем случае будут соответствовать искомым метастабильным состояниям (таким как H- и B-конформации A-домена RIα), средние значения характеристик белка по кластерам определят свойства и особенности строения этих состояний, а сравнение заселенностей кластеров позволит оценить относительную устойчивость соответствующих им конформаций.

Существует два подхода к кластеризации данных, полученных в ходе МД моделирований [92 – 94]. При геометрической кластеризации, расстояние между микроконформациями представляет собой меру различия их пространственного строения. Недостатком этого подхода является то, что для некоторых ландшафтов свободной энергии структурно схожие конформации принадлежат разным энергетическим минимумам, а различающиеся конформации, напротив, соответствуют в реальности одному метастабильному состоянию. При кинетической кластеризации расстояние между микроконформациями определяется не их структурными особенностями, а частотой переходов между ними. Такой подход гарантирует

выявление истинных метастабильных состояний, но требует гораздо большего массива данных, поэтому на настоящий момент он реализован только для очень маленьких систем.

В соответствии с вышесказанным анализ равновесия между конформациями β-субдомена А-домена RIα был произведен нами путем геометрической кластеризации. Чтобы снизить вероятность ошибки, присущей этому методу, мы выделили восемь коллективных переменных, которые в предварительных расчетах показали себя хорошими маркерами для разграничения H- и B-конформаций. Расстояние между микроконформациями было определено в пространстве этих переменных. Первые две из них, $RMSD_B$(ФСК) и $RMSD_H$(ФСК), представляют собой среднеквадратичное отклонение положений атомов основной цепи ФСК (а. о. 198 – 211) в рассматриваемой микроконформации от положений этих же атомов в B- (PDB ID 1NE6) и H- (PDB ID 3PVB) конформациях соответственно (подробнее о функции RMSD – в разделе 2.5.1). Третья переменная описывает энергию взаимодействия остатка L203 с гидрофобным карманом, образованным остатками β2β3-петли – G169, D170 и N171. Как следует из результатов, полученных до проведения кластерного анализа и изложенных в главе 4, упаковывание L203 в этот карман является обязательной чертой B-конформации. Четвертая, пятая и шестая переменные соответствуют межатомным расстояниям G199(O)–L203(N), G199(O)–A202(N) и A202(O)–T207(N), которые характеризуют водородные связи между атомами основной цепи B`-спирали и служат более детальному описанию ее конформации. Седьмая и восьмая переменные представлены расстояниями G169(N)–G206(O) и G169(N)–T207(O) (в H-конформации это длины водородных связей). В совокупности они определяют расстояние между β2β3-петлей и ФСК.

Кластерный анализ проводили с помощью программы Statistica 10 [95], используя метод К-средних и манхэттенское расстояние [96], комбинация которых позволила достигнуть наилучшего выделения кластеров. Сначала количество кластеров оценивалось путем v-кратной перекрестной проверки (v-fold cross-validation), встроенной в программу Statistica. Затем кластеризацию повторяли на этой же совокупности данных, но уже указывая количество кластеров и варьируя положение их начальных центров, благодаря чему были уточнены их границы.

Для перехода от восьмимерного пространства, в котором производилась кластеризация, к удобному для визуализации двумерному пространству мы следовали методике, предложенной ранее в одной из аналогичных работ [97]. Согласно этой методике в исходном восьмимерном пространстве на той же совокупности данных, что и кластеризация, проводился факторный анализ по методу главных компонент. Анализируемые данные проецировались на пространство первых двух главных компонент (PC1 и PC2), имеющих максимальные значения собственных чисел, а потому характеризующих основную долю дисперсии, свойственную исходному набору

данных. На итоговых двумерных изображениях разные кластеры окрашивались в разные цвета.

Каждый полученный кластер предположительно представлял собой метастабильную конформацию β-субдомена, характеризовался заселенностью (долей всех точек-микроконформаций, приходящихся на этот кластер) и описывался средними по кластеру значениями восьми выбранных переменных. По этим восьми признакам выделенные кластеры сравнивались между собой с использованием пакета программ SPSS[10] [98].

Сначала было произведено сравнение между кластерами, соответствующими одним и тем же конформациям в разных исследуемых системах. Целью такого анализа было выявление вариаций пространственной структуры β-субдомена в пределах одной конформации в зависисмости от свойств остатка в 209-ом положении и наличия/отсутствия лиганда в связывающем сайте. Из-за большого размера выборки (15 000 – 150 000 точек-микроконформаций для каждой системы) все различия между кластерами оказались статистически значимыми. Тем не менее за этой значимостью не было видно реальных физических различий. Таким образом, мы предположили, что остаток в положении 209 и лиганд в связывающем сайте не оказывают влияния на структуру конформаций β-субдомена и, основываясь на этом, усреднили кластеры (средние по кластерам значения каждой из восьми переменных), соответствующие одинаковыми конформациями во всех рассматриваемых системах. Затем были исследованы различия между разными конформациями, представленными усредненными на предыдущем этапе кластерами. Это задача выполнялась с использованием одномерного однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). По результатам его проведения для изучения различий между конформациями по каждой из переменных средние значения этих переменных сравнивались попарно при помощи теста наименьшей значимой разности (LSD, least significant difference).

2.4. Изучение H→B конформационного перехода A-домена ПКА Iα

Для исследования перехода A-домена RIα из H- в B-конформацию и определения роли гидрофобного «переключателя» в его протекании (третья и четвертая задачи диссертации, названные в разделе Введение, стр. 8) было предпринято моделирования целого A-домена, включающего в себя как β-, так и α-субдомен.

2.4.1. Подготовка A-домена

Подготовка A-домена RIα (а. о. 118 – 242) к моделированию его конформационного перехода проводилась так же, как и подготовка соответствующего ему β-субдомена (раздел

[10] Обработка результатов по описанной далее в разделе 2.3.3 методике выполнялась при участии Вершининой Е.А., что нашло отражение в совместной публикации.

2.3.1). Единственное различие состояло в том, что среди всех систем, несущих мутационные замены R209, в этом эксперименте была оставлена только система с заменой R209K. На основании данных о ее конформационных изменениях предполагалось сделать окончательные выводы о роли электростатического «переключателя» R209–D170–R226 в переходе А-домена из Н- в В-конформацию.

2.4.2. Моделирование Н→В конформационного перехода А-домена ПКА Iα методами молекулярной динамики

2.4.2.1 Методика моделирования Н→В конформационного перехода А-домена RIα

Моделирование перехода А-домена RIα из Н- в В-конформацию проводилось методами классической и ускоренной МД (об ускоренной МД – раздел 2.4.2.2) с использованием программы NAMD 2.8 [87]. Параметры силового поля, растворитель, граничные условия, шаг интегратора и алгоритм минимизации энергии перед постановкой МД использовались те же, что и при моделировании отдельного β-субдомена (раздел 2.3.2). Кроме того, в соответствии с изложенной в разделе 2.3.2 методикой и исходя из названных там причин, положение β2β3-петли А-домена (а также положение боковой цепи K209 в системе с мутационной заменой R209K) в течение всего времени моделирования поддерживалось с помощью внешних сил.

Всего было получено тринадцать траекторий, представляющих собой пути перехода А-домена из Н- в В-конформацию (из них двенадцать для домена белка дикого типа и одна для домена с мутационной заменой R209K). Мера достижения В-конформации в каждом случае оценивалась по положению конформационно подвижных фрагментов белка (ФСК, N3A-мотива, B/C-спирали) относительно их положения в В-конформации. Численно такая оценка проводилась с помощью RMSD-функций, как описано в разделе 2.5.1.

В общем случае разработанная нами методика моделирования Н→В конформационного перехода включала в себя пять последовательных этапов.

На **первом этапе** комплекс, представляющий собой А-домен в Н-конформации с цАМФ, находящимся в связывающем сайте, нагревался в течение 100 пс до температуры близкой к 350 K, а затем моделировался в NVE ансамбле до перехода ФСК в В-конформацию. Если ожидаемых изменений ФСК не происходило за 10 нс, то такая система не использовалась для дальнейших расчетов. Этот отбор был вызван необходимостью сокращения массива данных для последующего анализа и экономией дискового пространства.

Остальные этапы моделирования проводились в NVT ансамбле при температуре 300 K, поддерживаемой постоянной с использованием динамики Ланжевена (коэффициент трения γ составлял 5 $пс^{-1}$).

На **втором этапе** методом классической МД моделировались события, описанные Хольгером Рехманном в рамках модели гидрофобного «переключателя» (раздел 1.3.2). Как только все изменения конформации, относящиеся к работе гидрофобного «переключателя», можно было считать совершившимися, начинался **третий этап** моделирования, отличающийся от второго применением ускоренной МД (подробнее – раздел 2.4.2.2). Цель этого этапа состояла в получении π-спирального фрагмента в составе B/C-спирали, на месте которого, в соответствии с нашим предположением, должен был возникнуть излом между B- и C-спиралями (излом показан на рисунке 1.2 Б). Важно отметить, что необходимость третьего этапа определяется состоянием системы – и в ряде опытов он был опущен, так как переход фрагмента B/C-спирали в π-форму происходил в рамках классической МД на втором этапе моделирования. **Четвертый этап** моделирования проводился методом классической МД и длился до тех пор, пока на границе B- и C-спиралей не начинал формироваться излом. Завершение этого процесса в рамках четвертого этапа часто становилось очень долгим из-за образования электростатического взаимодействия между аминокислотными остатками K240 (C-спираль) и D140 (N3A-мотив). Факт антагонизма между названным взаимодействием и формированием излома B/C-спирали хорошо известен в литературе [36]. Поэтому перед **пятым этапом** моделирования мы производили мутационную замену K240A (а вместе с ней и R239A), позволяющую A-домену беспрепятственно и быстро завершить переход в B-конформацию. Моделирование на этом этапе также проводилось методом классической МД и длилось после визуального определения B-конформации еще 10 – 15 нс. Последнее было необходимо для подтверждения стабильности полученных нами структур и оценки их соответствия B-конформации.

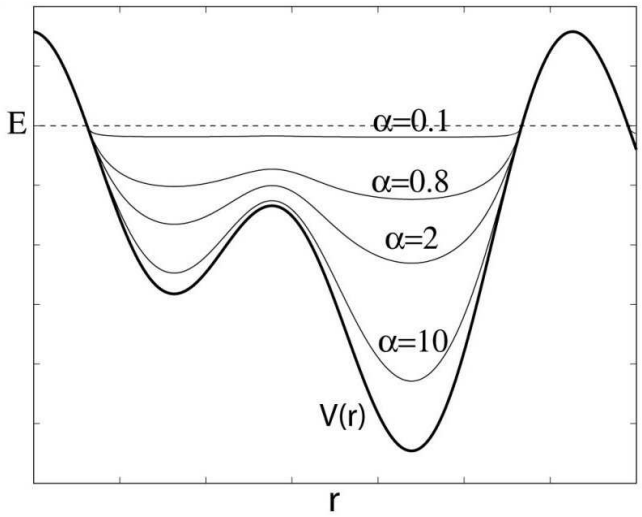
В рамках предложенной методики среднее время перехода A-домена из H- в B-конформацию составляет приблизительно 30 нс (17 – 52 нс для доменов белка дикого типа и 16 нс для домена с мутационной заменой R209K), а общее время моделирования, более продолжительное из-за длительного уравновешивания системы на последнем этапе, – 40 – 45 нс. Оба показателя относительно малы по сравнению с временами, характеризующими обычно конформационные переходы белка, что делает описанную методику легко воспроизводимой при любом уровне вычислительных возможностей.

2.4.2.2. Метод ускоренной молекулярной динамики (уМД)

Метод ускоренной молекулярной динамики (accelerated molecular dynamics, aMD, уМД) [99, 100] встроен в пакет программ NAMD. В его основу положено увеличение скорости конформационных изменений молекул при уменьшении глубины энергетических минимумов. На практике этот метод реализован следующим образом. К потенциальной функции системы

V(r) (или к ее компоненте) добавляется повышающее слагаемое (boost potential) *ΔV(r)*, которое равно нулю, если $V(r) \geq E$, и описывается выражением $\frac{(E - V(\vec{r}))^2}{\alpha + E - V(r)}$, если $V(r) < E$. Здесь α (положительное вещественное число) и *E* (вещественное число) – параметры, значения которых выбираются исходя из характеристик исследуемой молекулы. *E* представляет собой порог, к которому стремится потенциальная энергия системы *V*(r)=V(r)+ΔV(r)*, если $V(r) < E$; а α – так называемый фактор ускорения, определяющий насколько близка потенциальная функция *V*(r)* к уровню *E* и насколько плоской является ее поверхность. Легко показать, что наибольшее ускорение конформационных переходов достигается при больших значениях *E* и маленьких значениях α, однако моделирование при таких условиях часто оказывает дестабилизирующее воздействие на систему.

Схема, иллюстрирующая изменение функции потенциальной энергии при переходе от классической МД к уМД, представлена на рисунке 2.1.



Когда потенциальная энергия системы *V(r)* (показана жирной линией) становится ниже порогового уровня *E*, к ней добавляется повышающее слагаемое. Измененный профиль потенциальной энергии (тонкими линиями показано несколько вариантов этого профиля в зависимости от значения параметра *α*) характеризуется меньшими барьерами, разделяющими энергетические минимумы, чем исходный профиль. Рисунок взят из [101]

Рисунок 2.1 – Изменение функции потенциальной энергии при переходе от классической МД к уМД

В рамках настоящей работы повышающее слагаемое *ΔV(r)* добавлялось только к диэдральному компоненту потенциальной функции ($V_{диэдр}$), чтобы способствовать быстрому изменению диэдральных углов, но при этом не препятствовать образованию гидрофобных взаимодействий. В соответствии с нашими предположениями, подтвержденными впоследствии результатами работы (раздел 6.3.3), такой подход наилучшим образом отвечал задаче

моделирования перехода фрагмента B/C-спирали в π-форму.

Выбор значений параметров E и α, как уже было отмечено выше, зависит от свойств конкретной системы, но в качестве начального приближения можно использовать следующие эмпирические правила [102]:

$$E = V_{диэдр} + 4N \ ,$$

$$\alpha = 4/5\, N \ , \text{ где}$$

N – количество аминокислотных остатков белка.

В исследуемом нами A-домене RIα (а. о. 118 – 242) содержится 125 аминокислотных остатков. Значение $V_{диэдр}$, определенное в ходе второго этапа моделирования (раздел 2.4.2.1) в среднем равняется 500 ккал/моль. Таким образом, в соответствии с названными эмпирическими правилами значения параметров E и α в первом приближении составляют 1000 и 100 ккал/моль соответственно.

Тем не менее в процессе экспериментального подбора условий уМД мы отступили от этого начального приближения, уменьшив пороговое значение E (*800 – 1000* ккал/моль в зависимости от конкретного опыта)[11], но приблизив $V^*_{диэдр}$ к этому порогу, благодаря уменьшению значения α (2 ккал/моль). Как показывают предпринятые нами оценки (таблица 2.1) такое отступление не приводит к существенному увеличению повышающего слагаемого $\Delta V(r)$, а напротив, в некоторых случаях способствует его уменьшению (при E = 800 ккал/моль), что в целом благоприятно сказывается на стабильности системы в ходе уМД моделирования. Кроме того, допустимость выбранных нами значений E и α косвенно подтверждается полученными результатами: переходом фрагмента B/C-спирали в π-форму и сохранением нативной конформации остальных структур A-домена (в том числе наименее стабильных N- и C-концевых его участков).

[11] В трех опытах E равнялось 850 ккал/моль, по два опыта было проведено со значениями E 800, 900 и 1000 ккал/моль, в четырех оставшихся опытах переход фрагмента B/C-спирали ФСК в π-форму происходил без применения метода уМД

Таблица 2.1 – Зависимость диэдрального компонента потенциальной энергии при уМД ($V^*_{диэдр} = V_{диэдр}+\Delta V$) от выбора значений параметров E и α[12]

	E = 1000 ккал/моль α = 100 ккал/моль		E = 1000 ккал/моль α = 2 ккал/моль		E = 900 ккал/моль α = 2 ккал/моль		E = 800 ккал/моль α = 2 ккал/моль	
$V_{диэдр}$	ΔV	$V^*_{диэдр}$	ΔV	$V^*_{диэдр}$	ΔV	$V^*_{диэдр}$	ΔV	$V^*_{диэдр}$
500	417	917	498	998	398	898	298	798
600	320	920	398	998	298	898	198	798
700	225	925	298	998	198	898	98	798
800	133	933	198	998	98	898	0	800
900	50	950	98	998	0	900	0	900
1000	0	1000	0	1000	0	1000	0	1000

2.4.3. Математическая обработка результатов методами факторного и кросскорреляционного анализов

Для описания перехода А-домена RIα из Н- в В-конформацию было отобрано двадцать шесть коллективных переменных (параметров), краткая характеристика которых дана в таблице 2.2. Среди перечисленных переменных есть расстояния между атомами, энергии взаимодействия между группами аминокислотных остатков и RMSD, характеризующие близость конформационно подвижных фрагментов белка (ФСК, N3A-мотива и B/C-спирали) к В-конформации. Подробно смысл каждого из параметров поясняется при изложении результатов в главе 6.

Для каждой из полученных траекторий мы строили зависимость значений всех параметров от времени и, определив промежутки, на которых все кривые выходили на плато, разделяли по ним траектории на этапы. Важно отметить, что эти этапы не совпадали для разных траекторий, а сам процесс разделения носил чисто технический характер и был необходим для корректного определения коррелирующих параметров в процессе факторного анализа.

Переходя в представлении траекторий от фазового пространства к пространству выбранных коллективных переменных, мы преследовали цель уменьшить размерность данных с 3N×T (где N = 1990 – число атомов белка и лиганда, а T – число точек траектории), до 26×T, сохранив при этом информацию о Н→В конформационном переходе А-домена. Суть дальнейшей обработки данных сводилась к выявлению и описанию отдельных

[12] Все значения энергий в таблице приведены в ккал/моль. Значения ΔV рассчитаны по формуле $\frac{(E-V(\vec{r}))^2}{\alpha+E-V(r)}$, приведенной в данном разделе.

конформационных изменений белка, для чего применялся метод факторного анализа, а также установлению временно́го порядка этих изменений с помощью кросскорреляционного анализа. Оба исследования проводились с использованием программы SPSS [98].

Таблица 2.2 – Параметры, выбранные для описания перехода А-домена RIα из Н- в В-конформацию

Параметр	Что характеризует параметр
$RMSD_B$(ФСК), Å	Конформация ФСК
G199(O)–A202(N), Å	
E200(O)–I204(N), Å	
L201(O)–Y205(N), Å	
A202(O)–T207(N), Å	
E (L203/G169,D170,N171), ккал/моль	
G169(N)–T207(O), Å	Положение ФСК относительно β2β3-петли
G169(N)–G206(O), Å	
L201(N)–цАМФ(O6), Å	Связывание цАМФ
A202(N)–цАМФ(O3`), Å	
E (L203,I204/L135,F136), ккал/моль	Положение N3A-мотива относительно ФСК и С-спирали
L135(Cα)–I204(Cα), Å	
E (Y229/L135,F136), ккал/моль	
$RMSD_B$(N3A), Å	
$RMSD_B$(B/C-h), Å	Положение и конформация С-спирали
E (Y229/F172,E200,L203,I204), ккал/моль	
Y229(O)–M234(N), Å	
R230(O)–M234(N), Å	
R230(O)–G235(N), Å	
R231(O)–G235(N), Å	
E (L233/L135,F136,L139), ккал/моль	
E (M234/I204), ккал/моль	
R231(O)–S236(N), Å	
I232(O)–S236(N), Å	
E (R241/E200), ккал/моль	
E (L238/I204), ккал/моль	

Факторный анализ[13] по методу главных компонент выполнялся в отдельности для каждого этапа каждой траектории. По его результатам были выявлены факторы, которые объединяли коррелирующие между собой параметры. В общем случае, независимо от типа данных, за каждым из факторов стоит скрытая от наблюдения характеристика (латентная переменная). В приложении к нашим данным латентной переменной является одно или несколько одновременно протекающих конформационных изменений белка. Среди всех факторов, собственные числа которых превышали 1 (критерий Кайзера), нас интересовали только те, которые можно было соотнести с направленными во времени конформационными изменениями. Эти факторы мы исследовали с использованием кросскорреляционного анализа.

Так как значения исходных параметров зависят от времени, то от времени зависят и значения латентных переменных (факторные значения). Промежутки времени, в течение которых происходили основные изменения последних, мы обозначили как стадии конформационного перехода и определили порядок их следования в пределах каждого этапа. Для этого были рассчитаны кросскорреляционные функции зависимостей от времени всех пар рассматриваемых латентных переменных. При установлении порядка стадий в пределах траекторий учитывалась также очередность этапов, на которые первоначально эти траектории были разделены.

Результаты анализа для каждой траектории приведены в приложении В и представлены в виде факторов, расположенных в порядке следования во времени соответствующих им стадий. Дальнейшей статистической обработке результаты исследования не подвергались. Тем не менее визуально структура факторов, их количество и порядок наступления стадий сравнивались между опытами. По итогам сравнения удалось установить, что существуют группы параметров, коррелирующих друг с другом во всех опытах, и соответственно всегда объединенных в один фактор. Мы предположили, что этим группам соответствуют элементарные, обязательные для рассматриваемого перехода конформационные изменения белка, которые удобно называть событиями. Полученные нами пути перехода А-домена из Н- в В-конформацию состояли из разного количества стадий, но все они включали в себя ровно семь событий, и эти события не различались между опытами. Исходя из сделанного наблюдения, мы рассмотрели механизм Н→В конформационного перехода А-домена как последовательность выявленных событий и привели его описание в главе 6.

[13] Автор глубоко признателен Вершининой Е. А. за помощь в проведении факторного и кросскорреляционного анализов

2.5. Дополнительные программы и методики, применяемые при постановке моделирований и анализе их результатов

2.5.1. Выравнивание пространственных структур цАМФ-связывающих доменов и расчет RMSD между ними

RMSD[14] представляет собой численную меру различия двух пространственных структур одинаковых или схожих молекул (или их фрагментов) и определяется по формуле:

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N} \left(r_i(t_1) - r_i(t_2)\right)^2}{N}}$$, где

N – число атомов, положения которых сравниваются,

$r_i(t)$ – положение *i*-ого атома молекулы *t* (если сравнение идет между разными молекулами) или же *t* обозначает момент времени (если исследуется изменение RMSD молекулы в течение некоторого промежутка времени).

С последним вариантом связано использование RMSD как характеристики перехода молекулы из одной конформации в другую. В таком случае задают функцию *RMSD(t)*, каждая точка которой определяет меру отличия конформации молекулы в момент времени *t* и от той ее конформации, которая должна реализоваться в результате рассматриваемого перехода. По поведению этой функции можно составить представление о скорости процесса перехода, степени его протекания, а также о количестве стадий его составляющих. В настоящей диссертации было использовано пять таких функций. Четыре из них характеризуют конформацию надвторичных структур А-домена (ФСК, B/C-спирали и N3A-мотива), а также А-домена в целом по отношению к В-конформации: $RMSD_B$(ФСК), $RMSD_B$(B/C-h), $RMSD_B$(N3A) и $RMSD_B$(A) соответственно. Пятая функция, $RMSD_H$(ФСК), представляет собой меру удаленности текущей конформации ФСК от ее Н-конформации[15]. Анализ перечисленных функций применялся в ходе решения трех задач: кластеризации конформаций β-субдомена (раздел 2.3, глава 5), определения полноты протекания конформационного перехода А-домена (раздел 6.1) и выявления механизма этого перехода (разделы 2.4, 6.2 – 6.4). В методиках,

[14] Аббревиатура RMSD расшифровывается либо как среднеквадратичное отклонение (root mean square deviation), что более привычно, либо как среднеквадратичное расстояние (root mean square distance), что лучше описывает конкретные задачи. Действительно, при изучении пространственных структур белков, кроме задачи сравнения заданной структуры с ее математическим ожиданием, часто возникает необходимость сравнить или выравнять ряд структур, непосредственно полученных в ходе компьютерного или физического эксперимента. Говорить в этом случае о среднеквадратичном отклонении мы считаем не совсем корректным.

[15] При расчете RMSD здесь и далее учитывались только атомы основной цепи: N, Cα, C

основанных на применении факторного или кластерного анализа, рассматривался весь спектр значений RMSD, полученный в ходе моделирования. В противоположность этому в рамках второй задачи учитывались лишь те отрезки времени, на которых графики всех исследуемых функций RMSD выходили на плато, и этот выход можно было предварительно соотнести с образованием B-конформации. В таком случае значения RMSD на выбранных участках усреднялись по времени. Итоговые средние значения использовались для подтверждения или опровержения предположения о достижении B-конформации.

Минимизация RMSD между пространственными структурами белков называется их выравниванием. В настоящей диссертации выравнивание проводилось по атомам, не изменяющим свое положение в ходе конформационных изменений белка, и предшествовало построению названных выше RMSD функций. Необходимость выравнивания в данном случае обусловлена движением центра масс белка, приводящим к появлению компоненты, завышающей реальные значения анализируемых RMSD. Кроме того, иллюстрации, сделанные после устранения этой компоненты, более наглядно описывают конформационные изменения белка. К числу «неподвижных» атомов в A-домене относятся атомы основной цепи (N, CA, C) аминокислотных остатков V154 – I163, Y173 – V182, T190 – G195, K214 – I224, а в B-домене им соответствуют атомы остатков V272 – V281, F291 – V300, G314 – S319, V338 – L348. Названные фрагменты белковой цепи образуют β-слои β-субдомена и не включают в себя остатки конформационно подвижных ФСК, β2β3-петли и других петель между β-слоями.

Расчет RMSD и выравнивание пространственных структур A- и B-доменов проводились с использованием программы VMD [103].

2.5.2. Измерение углов между спиралями

Углы между осями спиралей были измерены с помощью программы MOLMOL версии 2K.2 [104].

2.5.3. Визуализация третичных структур

Визуализация всех исследуемых белковых комплексов ПКА Iα выполнялась с использованием программы VMD [103].

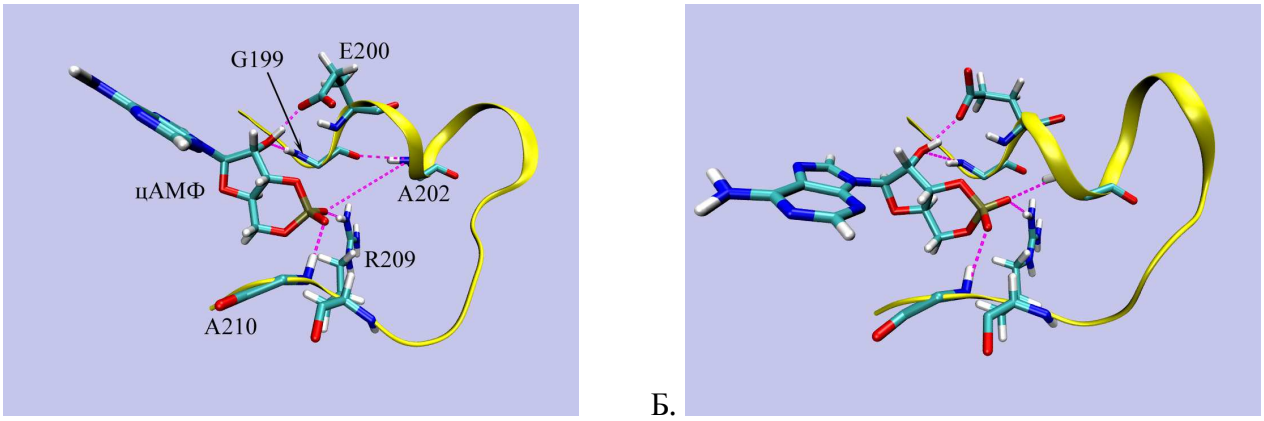
3. АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИГАНДОВ СО СВЯЗЫВАЮЩИМИ САЙТАМИ А- И В-ДОМЕНОВ ПКА Iα

В первой из четырех глав, посвященных изложению полученных нами результатов, приведены данные, полученные с использованием методов докинга и квантово-химического анализа и характеризующие взаимодействие лигандов (цАМФ, Sp-цАМФS и Rp-цАМФS) с цАМФ-связывающими сайтами А- и В-доменов R-субъединицы ПКА Iα.

Дополнением к главе является предложенная нами термодинамическая модель активации ПКА Iα (приложение Б). Ее создание было обусловлено необходимостью объяснить различие между определенными в ходе докинга и измеренными экспериментально значениями констант связывания лигандов с А- и В-доменами RIα субъединицы. Однако эта модель пригодна также для оценки справедливости значений других констант, характеризующих активацию ПКА Iα. Последний факт немаловажен, так как, судя по данным, приведенным в таблицах 1.1 и 1.2, между результатами экспериментальных измерений существует много противоречий.

3.1 Докинг цАМФ в цАМФ-связывающие сайты А- и В-доменов ПКА

В рамках данной работы был проведен докинг цАМФ в цАМФ-связывающие сайты А- и В-домена регуляторной субъединицы ПКА Iα. Для обоих доменов рассматривались как Н-, так и В-конформации. По результатам докинга положения цАМФ в связывающих сайтах А- и В-доменов принципиально не отличались друг от друга, поэтому на рисунке 3.1 представлены только структуры, полученные для А-домена.



А – Н-конформация; Б – В-конформация

Рисунок 3.1 – Докинг цАМФ в цАМФ-связывающий сайт А-домена регуляторной субъединицы ПКА Iα

В обоих доменах, находящихся в В-конформации, цАМФ образовывал пять водородных связей (рисунок 3.1 Б) с аминокислотными остатками ФСК (с амидными группами G199 (G323), A202 (A326) и A210 (A334) и с боковыми цепями E200 (E324) и R209 (R333)), что полностью

согласуется с данными рентгеноструктурного анализа [6, 27]. Однако в ходе докинга цАМФ в связывающие сайты доменов, находящихся в H-конформации, было показано наличие только трех водородных связей (G323, A334, R333) для B-домена и четырех (G199, A210, R209, E200) для A-домена (рисунок 3.1 A).

Боковые цепи остатков E200 и E324 в большинстве известных структур, представленных H-конформациями A- или B-доменов R-субъединицы ПКА Iα, связаны с N3A-мотивами соответствующих доменов. E200 образует водородную связь с амидной группой L135, а E324 – с амидной группой I253, остатка, являющегося гомологом L135 в B-домене. Однако в данной конкретной структуре A-домена связь E200 с N3A-мотивом была разрушена, а боковая цепь E200 замыкалась на амидную группу своего же остатка. Наличие такой «внутримолекулярной» водородной связи показано для A- и B-доменов, находящихся в B-конформации в отсутствие лиганда. То есть, среди всех структур A-домена, принадлежащих бассейну H-конформаций и реализующихся в присутствии C-субъединицы, рассматриваемая структура была ближе всего к B-конформации. Исходя из результатов докинга, положение боковой цепи E200, при котором она образует водородную связь с амидной группой своего же остатка, не препятствует образованию водородной связи между E200 и цАМФ. Таким образом, водородная связь E200(COO^-)–цАМФ(OH) или гомологичная ей связь в B-домене могут образовываться как в момент связывания цАМФ, так и во время перехода домена в B-конформацию, а следовательно, остатки E200 и E324 не играют главных ролей в конформационных переходах цАМФ-связывающих доменов. Подтверждает выдвинутую гипотезу и тот факт, что по данным рентгеноструктурного анализа [5] Rp-цАМФS, известный обратный агонист [65] цАМФ-связывающих доменов белков EPAC и ПКА, тоже образует водородную связь с E200 в H-конформации A-домена, однако конформационный переход, очевидно, не индуцирует. Кроме того, следует отметить, что в цАМФ-связывающих доменах белков EPAC, на месте рассматриваемых остатков глутаминовой кислоты находится глутамин, который не способен связывать лиганд.

В результате, единственная водородная связь, которая принципиально не могла реализоваться в H-конформации, – связь между цАМФ и амидной группой A202 (A326). Расстояние между атомом азота A202 (A326) и экзоциклическим экваториальным атомом кислорода O6 цАМФ составляло ~5,2 Å для A-домена и ~5,4 Å для B-домена, т. е. для образования связи необходимо было смещение амидной группы A202 (A326). Однако подобное смещение в H-конформации произойти не могло, так как амидная группа рассматриваемого аланина входила в остов 3_{10}-спирали ФСК и в соответствии с типом спирали образовывала водородную связь с карбонильной группой G199 (G323) (рисунок 3.1 A).

Нами также была проведена термодинамическая оценка связывания цАМФ с A- и B-

доменами ПКА Iα, находящимися как в H-, так и в B-конформации.

Стандартное изменение свободной энергии связывания цАМФ с A-доменом в B-конформации при температуре 304 K (ΔG^0, T = 304 K) составило -38,7 кДж/моль (ΔH^0 = -41,1 кДж/моль, $T\Delta S^0$ = -2,4 кДж/моль); при этом не учитывалась энергия π-электронного взаимодействия между ароматическим кольцом лиганда и боковой цепью W260. Такая оценка в общих чертах сопоставима с экспериментальной (ΔH^0 = -62,0 кДж/моль, $T\Delta S^0$ = -20,4 кДж/моль) [73], если принять во внимание, что в эксперименте энергия π-электронного взаимодействия учитывалась. Константа диссоциации (Kd) цАМФ из лиганд-белкового комплекса, соответствующая определенной нами ΔG^0, равна $2{,}3\cdot10^{-7}$M.

Стандартное изменение свободной энергии связывания цАМФ с B-доменом в B-конформации при температуре 304 K (ΔG^0, T = 304 K) составило -37,9 кДж/моль (ΔH^0 = -43,0 кДж/моль, $T\Delta S^0$ = -5,1 кДж/моль). Соответствующая константа диссоциации цАМФ из лиганд-белкового комплекса оказалась равной $3{,}1\cdot10^{-7}$M. Энергия π-электронного взаимодействия между ароматическим кольцом лиганда и боковой цепью Y371 так же, как в случае A-домена, при получении оценки не учитывалась.

Аналогичные оценки для A- и B-доменов в H-конформации оказались равны -24,6 и -24,7 кДж/моль и $5{,}9\cdot10^{-5}$M и $5{,}7\cdot10^{-5}$M соответственно.

Важно отметить, что если полученные нами значения констант связывания цАМФ с A и B-доменами, находящимися в B-конформации, близки к экспериментальным, то для H-конформаций тех же доменов наши оценки более чем на порядок превышают значения, приведенные в литературе (таблица 1.1). Наши соображения по поводу того, какими должны быть истинные значения этих и других констант, характеризующих активацию ПКА Iα, приведены в разделе 3.5.4 и приложении Б.

3.2. Докинг Sp-цАМФS в цАМФ-связывающий сайт B-домена ПКА

Sp-цАМФS в связывающем сайте B-домена, находящегося в H-конформации, занимал несколько другое положение, чем цАМФ. Он так же образовывал две связи с белком – с амидной группой G323 и боковой цепью R333 – по характеристикам ничем не отличающиеся от аналогичных связей, образуемых цАМФ. Однако связь между экзоциклическим аксиальным атомом серы и амидной группой A334 была разрушена (расстояние между тяжелыми атомами равнялось 4,4 Å). Вместо нее реализовывалась связь между амидной группой A334 и атомом кислорода O5`, входящим в шестичленный фосфатный цикл. Результатом образования такой связи была существенная деформация шестичленного фосфатного цикла Sp-цАМФS, который в отсутствие внешних факторов имеет тенденцию находиться в выгодной конформации «кресла».

Sp-цАМФS-связанный B-домен в B-конформации, напротив, был очень близок по

структуре к аналогичному цАМФ-связанному B-домену, что находится в полном соответствии с экспериментальными данными [27]. Как и цАМФ, Sp-цАМФS образовывал пять водородных связей с аминокислотными остатками ФСК (с амидными группами G323, A326 и A334 и с боковыми цепями E324 и R333). И только одна из этих связей – между экзоциклическим атомом серы S1 и амидной группой A334 – характеризовалась большей длиной (3,6 Å).

Оба комплекса Sp-цАМФS с B-доменом в H- и B-конформациях, судя по термодинамическим оценкам, оказались слабее, чем аналогичные комплексы, образованные при участии цАМФ.

Стандартное изменение свободной энергии связывания Sp-цАМФS с B-доменом в B-конформации при температуре 304 K (ΔG^0, T = 304 K) составило -36,7 кДж/моль (ΔH^0 = -51,7 кДж/моль, $T\Delta S^0$ = -15,0 кДж/моль). Соответствующая константа диссоциации Sp-цАМФS из лиганд-белкового комплекса равнялась $4{,}9 \cdot 10^{-7}$M. Энергия π-электронного взаимодействия, как и в случае цАМФ, не учитывалась.

Стандартное изменение свободной энергии связывания Sp-цАМФS с B-доменом в H-конформации при температуре 304 K (ΔG^0, T = 304 K) составило -18,1 кДж/моль (ΔH^0 = -12,2 кДж/моль, $T\Delta S^0$ = 5,9 кДж/моль). Соответствующая константа диссоциации Sp-цАМФS из лиганд-белкового комплекса равнялась $7{,}7 \cdot 10^{-4}$M.

3.3. Докинг Rp-цАМФS в цАМФ-связывающий сайт B-домена ПКА Iα

По результатам докинга Rp-цАМФS в цАМФ-связывающий сайт B-домена, находящегося в H-конформации, было установлено, что Rp-цАМФS образует с белком те же связи, что и цАМФ. Две из них – с амидными группами G323 и A334 – по характеристикам ничем не отличались от таковых, образуемых при участии цАМФ, а третья – с боковой цепью R333 – характеризовалась большей длиной (3,8 Å).

Однако выравнивание структур Rp-цАМФS- и цАМФ-связанных доменов в H-конформации показало различное положение экзоциклических экваториальных атомов кислорода и серы (более подробно в главе 4). Это различие связано с несколько иным размещением фосфатного кольца Rp-цАМФS и большей длиной ковалентной связи P–S (1,95 Å) по сравнению с P–O (1,50 Å) [105]. В результате расстояние между атомом азота A326 и экзоциклическим экваториальным атомом серы S1 Rp-цАМФS составило ~4,7 Å, что существенно меньше соответствующего расстояния, реализуемого при связывании агонистов цАМФ и Sp-цАМФS (~5,2 – 5,4 Å).

Положение экваториального атома серы S1, определенное по результатам докинга Rp-цАМФS в связывающий сайт B-домена, находящегося в B-конформации, практически полностью совпало с положением соответствующего экваториального атома кислорода O6

цАМФ. Таким образом, Rp-цАМФS образовывал пять водородных связей с теми же аминокислотными остатками белка, что и цАМФ: с амидными группами G323, A326 и A334 и с боковыми цепями E324 и R333. Однако две из этих связей (образуемые экзоциклическим экваториальным атомом серы с одной стороны и амидной группой A326 или боковой цепью R333 с другой стороны) характеризовались большей длиной (3,6 Å). Суммируя приведенные данные, можно сказать, что Rp-цАМФS-связанный B-домен в B-конформации хоть и представлялся несколько деформированным в сравнении с цАМФ-связанным B-доменом, однако существенно от него не отличался, что полностью подтверждается данными рентгеноструктурного анализа [27].

Выявленные особенности взаимодействия Rp-цАМФS со связывающими сайтами не могли не сказаться на термодинамических оценках. Оба комплекса Rp-цАМФS с B-доменом оказались слабее, чем аналогичные комплексы, образованные при участии цАМФ.

Стандартное изменение свободной энергии связывания Rp-цАМФS с B-доменом в B-конформации при температуре 304 K (ΔG^0, T = 304 K) составило -29,2 кДж/моль (ΔH^0 = -44,6 кДж/моль, $T\Delta S^0$ = -15,4 кДж/моль). Соответствующая константа диссоциации Rp-цАМФS из лиганд-белкового комплекса оказалась равной $9{,}7\cdot10^{-6}$M. Энергия π-электронного взаимодействия, как и в случае агонистов, не учитывалась.

Стандартное изменение свободной энергии связывания Rp-цАМФS с B-доменом в H-конформации при температуре 304 K (ΔG^0, T = 304 K) составило -22,5 кДж/моль (ΔH^0 = -16,6 кДж/моль, $T\Delta S^0$ = 5,9 кДж/моль). Соответствующая константа диссоциации Rp-цАМФS из лиганд-белкового комплекса равнялась $1{,}4\cdot10^{-4}$M.

3.4. Квантово-химический анализ параметров водородных связей, образуемых экваториальным атомом кислорода (серы) лиганда и амидной группой белка

Для анализа возможных механизмов обратного агонизма Rp-цАМФS (см. раздел 4.2) потребовалось оценить характеристики водородных связей, образуемых экзоциклическим атомом кислорода или серы и амидной группой белка.

По результатам квантово-химических расчетов для водородной связи между экзоциклическим атомом кислорода цАМФ и амидной группой белка характерны энергия –7,7 ккал/моль и длина 3,0 Å, определяемая как расстояние между тяжелыми атомами. Rp-цАМФS тоже образует водородную связь с амидной группой белка, однако такая связь менее выгодна по энергии (–4,7 ккал/моль) и характеризуется большей длиной (3,9 Å).

Как отмечено в разделах 3.2 и 3.3, увеличение длин водородных связей при замене экзоциклического атома кислорода атомом серы было получено и при проведении докинга. Таким образом, квантово-химические расчеты косвенно подтверждают справедливость

изложенных выше результатов докинга.

3.5 Обсуждение результатов

3.5.1. цАМФ-связывающий сайт А-домена R-субъединицы, находящейся в составе RC комплекса, может связывать цАМФ

При помощи метода докинга нам удалось показать способность А-домена R-субъединицы ПКА Iα, находящейся в комплексе с С-субъединицей, связывать лиганды. Эти данные позволили внести ясность в несоответствие между существующей моделью активации ПКА Iα и рядом экспериментальных фактов. Так, согласно искомой модели [4], молекула цАМФ не может связаться с А-доменом R-субъединицы, входящей в состав RC комплекса, пока В-домен не претерпел цАМФ-индуцированных конформационных изменений. Данное утверждение основано на результатах рентгеноструктурного анализа [4], указывающих на взаимодействие ряда аминокислотных остатков цАМФ-связывающего сайта А домена с С-субъединицей, и согласуется с установленным порядком связывания цАМФ с доменами ПКА Iα [68]. Однако ему противоречит возможность цАМФ-индуцированной активации RC комплексов, лишенных В-домена или содержащих в нем препятствующие связыванию цАМФ мутации [67, 69]. Единственным возможным механизмом цАМФ-индуцированной активации таких мутантных комплексов представляется связывание цАМФ с А-доменом R-субъединицы, способствующее переходу последнего в В-конформацию. Результаты докинга делают такое предположение правдоподобным. Нами были определены аминокислотные остатки, участвующие в связывании цАМФ А-доменом, находящимся в Н-конформации, и среди этих остатков не оказалось тех, которые взаимодействуют с С-субъединицей. Кроме того, структуры С-субъединицы не препятствуют попаданию цАМФ в связывающий сайт, хотя и ограничивают пути его перемещения. Таким образом, принципиальная возможность связывания цАМФ с А-доменом R-субъединицы, входящей в состав RC комплекса, существует. Стоит отметить, что это утверждение не противоречит данным кинетических исследований [68]. Ведь, даже экспериментально подтвержденный факт связывания цАМФ с А-доменом не дает основания полагать, что такое связывание, в отличие от связывания с В-доменом, инициирует активацию не несущей мутаций ПКА Iα. Действительно, структура А-домена весьма эффективно стабилизирована многочисленными межбелковыми контактами с С-субъединицей, затрудняющими движения больших групп атомов. Напротив, В-домен, если и связан с С-субъединицей, то только несколькими связями [4, 70]. Поэтому логично предположить, что наиболее быстрым путем активации ПКА Iα является связывание цАМФ с В-доменом, приводящее к смещению С-спирали А-домена с поверхности С-субъединицы, и, как следствие,

к ускорению цАМФ-зависимого конформационного перехода А-домена. Прямых доказательств этой гипотезы пока не существует, однако есть экспериментальные факты, косвенно ее подтверждающие. Так продемонстрировано, что обратный агонист ПКА Iα Rp-цАМФS является слабым агонистом ПКА Iα с заменами аргинина в положении 209 на ряд других остатков [34, 64]. Как показано нами в следующей главе диссертации, Rp-цАМФS блокирует конформационный переход цАМФ-связывающих доменов из H- в B-конформацию, однако может связываться с доменом, находящимся в B-конформации, причем таким же образом, как цАМФ. Известно, что B-домен ПКА Iα практически не взаимодействует с C-субъединицей и поэтому часть времени проводит в B-конформации [70]. В то же время вероятность связывания Rp-цАМФS с А-доменом, находящимся в H-конформации, значительно снижена из-за мутаций аминокислотных остатков, взаимодействующих с лигандом. Принимая во внимание все перечисленные факты, объяснить агонизм Rp-цАМФS можно только допустив, что его связывание с B-доменом ускоряет цАМФ-независимый конформационный переход А-домена, который, вероятно, протекает по тому же механизму, что и цАМФ-индуцированный.

3.5.2. Rp-цАМФS и Sp-цАМФS могут образовывать стабильные комплексы как со свободной R-субъединицей, так и с R-субъединицей, входящей в состав RC комплекса

Полученные нами данные однозначно свидетельствуют в пользу того, что все три лиганда (цАМФ, Sp-цАМФS и Rp-цАМФS) могут связываться с А- и B-доменами RIα, независимо от конформации последних, причем комплексы, образованные с доменами в B-конформации, характеризуются большей устойчивостью. Основываясь на этих результатах и на том, что А-домен в составе RC комплекса находится в H-конформации, можно предположить, что активация ПКА Iα в присутствии агонистов протекает преимущественно по пути индуцированного соответствия, а механизм обратного агонизма Rp-цАМФS заключается в блокировании перехода цАМФ-связывающих доменов из H- в B-конформацию. Следует отметить, что ранее было предложено другое объяснение механизма обратного агонизма Rp-цАМФS [5], согласно которому Rp-цАМФS действует по пути отбора конформаций, отдавая, в отличие от агонистов, предпочтение H-конформации цАМФ-связывающих доменов.

Установление истинных причин обратного агонизма Rp-цАМФS имеет принципиальное значение для понимания механизма активации ПКА Iα и конформационных переходов цАМФ-связывающих доменов и поэтому должно основываться на неоспоримых экспериментальных данных. В то же время полученные нами значения констант диссоциации лигандов из А- и B-доменов, находящихся в H-конформации, довольно сильно отличаются от экспериментальных. А следовательно, всю проведенную нами количественную оценку можно поставить под сомнение. Чтобы определить истинное положение дел в этом вопросе, мы создали модель,

дающую возможность, опираясь на немногочисленные достоверные экспериментальные данные, оценить значения всех констант, характеризующих процесс активации ПКА Iα. Описание этой модели дано в приложении Б, а обсуждению полученных оценок посвящен раздел 3.5.4.

3.5.3. Смещение амидной группы A202(A326) может запускать конформационный переход цАМФ-связывающих доменов

Полученные методом докинга данные об отсутствии связи между цАМФ и A202(A326) в H-конформации цАМФ-связывающих доменов представляют собой абсолютно новый научный результат. На его основании мы предполагаем, что именно смещение амидной группы A202 (A326) должно приводить к изменению структуры ФСК, а следовательно, запускать конформационный переход всего домена.

Причины, по которым об этом процессе до сих пор не было известно, вероятно, лежат в неустойчивости комплекса цАМФ-связывающего домена в H-конформации с цАМФ. Связавшись с сайтом, цАМФ сразу индуцирует конформационный переход домена, при этом происходит образование искомой водородной связи. Таким образом, до настоящей работы негласно полагалось, что взаимодействие между амидной группой A202 (A326) и цАМФ устанавливается сразу при связывании цАМФ и потому играть роль в запуске конформационного перехода не может. Лишь в последних работах [5], посвященных анализу электростатического и гидрофобного «переключателей», допускается, что остаток A202 все-таки принимает участие в функционировании последнего, но только в качестве гидрофобного окружения цАМФ посредством своей боковой группы совместно с остатками L201, L203 и I204.

Если наше предположение о ключевой роли A202 (A326) в конформационном переходе цАМФ-связывающих доменов верно, то оно объясняет начальный этап механизма передачи информации о связывании лиганда на удаленные структуры белка. Кроме того, можно допустить, что Rp-цАМФS блокирует переход цАМФ-связывающих доменов из H- в B-конформацию, создавая препятствия смещению амидной группы A202 (A326).

Доказательству выдвинутой нами гипотезы посвящены четвертая, пятая и шестая главы настоящей диссертации.

3.5.4 Численная оценка значений констант, характеризующих процесс активации ПКА Iα

Как уже отмечалось выше, полученные нами численные оценки значений констант диссоциации цАМФ из связывающих сайтов A- и B-доменов, находящихся в H-конформации, существенно отличаются от экспериментальных. Однако из таблиц 1.1 и 1.2 следует, что между экспериментальными оценками, приведенными в разных работах, также существует много

противоречий. Чтобы понять, какие из имеющихся значений ближе всего к истине, мы предложили модель активации ПКА Iα. В ее основу легло представление об R-субъединице как о конкурентном[16] ингибиторе С-субъединицы, препятствующем проявлению ферментативной активности последней. Процесс превращения субстрата реакции (пептида кемптида) в продукт под действием С-субъединицы мы рассмотрели в рамках квазистационарного приближения Михаэлиса-Ментен. Описание данной модели и полученные с ее использованием численные оценки приведены в приложении Б.

Значения всех рассматриваемых констант, определенные в рамках модели, (таблицы Б.1 и Б.2) согласуются друг с другом и с основными экспериментальными данными, не противоречат ожиданиям, базирующимся на логических заключениях, а следовательно, могут служить первым приближением для исследования термодинамических аспектов активации ПКА Iα. В этой связи важно отметить, что значения констант диссоциации цАМФ из связывающих сайтов А- и В-доменов, рассчитанные нами в ходе докинга и оцененные с использованием предложенной модели, оказались близки друг к другу. И хотя по результатам докинга все исследуемые белок-лигандные комплексы были охарактеризованы как более слабые, ошибка программы Quantum 3.3.0 была существенно меньше заявленной разработчиками предельной ошибки (15%).

Опираясь на полученное доказательство корректности численных оценок, предпринятых нами в ходе докинга, мы рассмотрели вопрос о роли механизмов индуцированного соответствия и отбора конформаций в процессе активации ПКА Iα.

Чтобы процесс активации ПКА Iα шел преимущественно путем индуцированного соответствия, очевидно, необходимо и достаточно выполнения трех условий. Во-первых, цАМФ-связывающие домены R-субъединицы должны находиться преимущественно в Н-конформации. Во-вторых, лиганд должен иметь сродство к обеим конформациям. В-третьих, константа скорости диссоциации в присутствии лиганда должна быть больше, чем в его отсутствии.

Согласно данным рентгеноструктурного анализа А-домен, входящий в состав R_AC комплекса, представлен Н-конформацией [4, 28, 29]. Наши данные однозначно демонстрируют, что оба агониста (цАМФ и Sp-цАМФS) связываются как с В-, так и с Н-конформациями цАМФ-

[16] В работе [76] говорится о R-субъединице как о смешанном ингибиторе С-субъединицы. У комплекса C(W196R):RI(R333K) Km увеличивается в 4 раза (что характерно для конкурентного ингибитора), а Vmax уменьшается в 1,6 раз (что характерно для неконкурентного ингибитора). Однако авторы не объясняют причины такого поведения R-субъединицы, а в других работах оно не описывается. Возможно также, что неконкурентное ингибирование характерно только для двойного мутанта C(W196R):RI(R333K). Поэтому мы рассматриваем ингибирование С-субъединицы R-субъединицей как конкурентное.

связывающих доменов. Кроме того, экспериментально показано, что константа скорости диссоциации R_AC комплекса увеличивается более чем на два порядка по сравнению со спонтанной диссоциацией, если процесс идет в присутствии цАМФ или его аналога Sp-цАМФS [42, 65]. Таким образом, предположения о существенной роли пути отбора конформаций при активации R_AC комплекса безосновательны.

Rp-цАМФS, как следует из наших данных, также связывается с обеими конформациями цАМФ-связывающих доменов, причем его комплексы с B-конформацией, как и в случае с агонистами, более устойчивые. Более того, в соответствии с экспериментальными данными присутствие Rp-цАМФS понижает константу скорости диссоциации R_AC комплекса почти на порядок по сравнению со спонтанной [65]. Эти факты однозначно свидетельствуют в пользу того, что Rp-цАМФS препятствует диссоциации R_AC комплекса не по механизму отбора конформаций (отбирая H-конформацию), как предполагалось ранее [5], а непосредственно блокируя переход из H- в B-конформацию.

Что касается $R_{AB}C$ комплекса, то здесь ситуация не столь однозначна. Дело в том, что, согласно экспериментальным данным, B-домен ПКА Iα практически не взаимодействует с C-субъединицей и существует в виде ансамбля конформаций [70]. Среди них, очевидно, присутствует и B-конформация. Исходя из этого факта, первая стадия диссоциации $R_{AB}C$ комплекса, представляющая собой связывание цАМФ с B-доменом, может протекать по механизму отбора конформаций. Дальнейшие процессы, как видно из относительно небольшого значения константы Kd_{2B} (см. прил. Б), мало отличаются от процессов диссоциации R_AC комплекса. Поэтому с небольшим допущением можно сказать, что активация $R_{AB}C$ комплекса тоже идет по пути индуцированного соответствия. Rp-цАМФS в таком случае связывается с B-конформацией B-домена (как и оба агониста), но препятствует переходу A-домена из H- в B-конформацию. Таким образом, суммарное действие Rp-цАМФS выражается в блокировании активации ПКА Iα.

Однако необходимо отметить, что существует по крайней мере две группы условий эксперимента, при которых диссоциация $R_{AB}C$ комплекса все же идет по пути отбора конформаций. К такому выводу приводит возможность использования в этих случаях в качестве активатора Rp-цАМФS, который не способен вызывать конформационные переходы цАМФ-связывающих доменов по пути индуцированного соответствия. Первая группа условий связана с подбором концентраций субстрата и цАМФ: субстрат должен быть в избытке [34], а концентрация цАМФ относительно мала (прим. автора диссертации). При достижении таких условий $RCcAMP_B$ комплекс с большей вероятностью диссоциирует на $RcAMP_B$ и свободную C-субъединицу, чем связывает вторую молекулу цАМФ. Вторая группа условий включает в себя необходимость наличия в цАМФ-связывающем сайте A-домена мутаций, препятствующих

связыванию лиганда [34, 64]. Тогда единственная молекула лиганда связывается с B-доменом, а дальнейшая диссоциация RC комплекса протекает спонтанно. В обоих названных случаях активация ПКА Iα идет по пути отбора конформаций за счет B-домена, что косвенно доказывает значительную степень заселенности B-конформации B-домена даже в составе RC комплекса.

3.6. Промежуточные выводы

1) A-домен R-субъединицы ПКА Iα, находящейся в комплексе с C-субъединицей, способен связывать лиганды.

2) цАМФ, Sp-цАМФS и Rp-цАМФS связываются, как с H-конформацией, так и с B-конформацией цАМФ-связывающих доменов, причем комплексы всех названных лигандов с B-конформацией характеризуются большей устойчивостью. Этот факт (в совокупности с тем, что в RC комплексе A-домен находится в H-конформации) говорит в пользу преимущественного протекания активации ПКА Iα по пути индуцированного соответствия. Механизм обратного агонизма Rp-цАМФS при этом должен заключаться в блокировании перехода из H- в B-конформацию.

3) Смещение амидной группы A202(A326) по направлению к лиганду, по всей видимости, является механизмом, запускающим конформационный переход цАМФ-связывающих доменов.

4. МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИГАНДОВ с цАМФ-СВЯЗЫВАЮЩИМ САЙТОМ цАМФ-СВЯЗЫВАЮЩИХ ДОМЕНОВ ПКА Iα

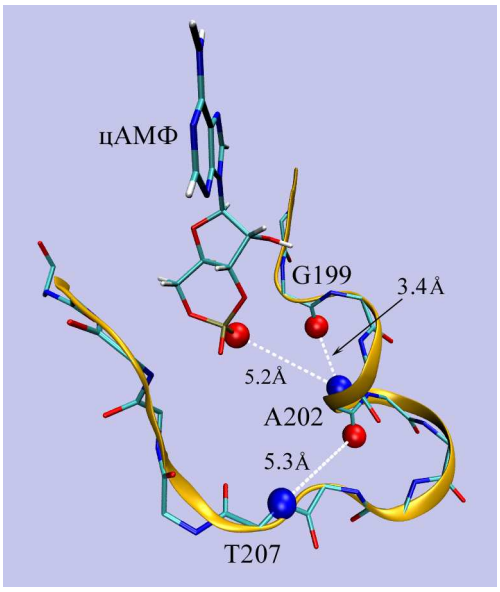
Согласно литературным данным [3, 4, 45], конформационные изменения цАМФ-связывающих доменов при активации ПКА Iα заключаются в их переходе из H- в B-конформацию. В соответствии с предположениями, высказанными в главе 3, к изменению конформации цАМФ-связывающего сайта, а посредством этого и всего домена, должно приводить смещение амидной группы A202 для A-домена и A326 для B-домена. Связывание Rp-цАМФS напротив должно препятствовать смещению искомых амидных групп, блокируя таким образом домены в H-конформации. Четвертая глава диссертации посвящена выяснению детальных механизмов этих процессов.

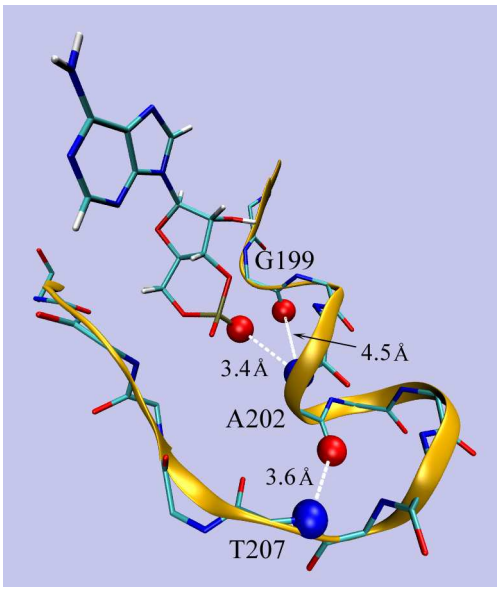
4.1. Взаимодействие цАМФ с цАМФ-связывающим сайтом A-домена ПКА Iα

В ходе моделирования динамики β-субдомена A-домена, цАМФ-связывающий сайт которого занят цАМФ, был продемонстрирован переход искомого субдомена из H- в B-конформацию. На рисунках 4.1 и 4.2 представлены структуры, типичные для H- (рисунки 4.1 А, 4.2 А) и B- (рисунки 4.1 Б, 4.2 Б) конформаций, и обозначены основные параметры, которые могут служить показателями, характеризующими конформационный переход домена.

Как уже было отмечено в главе 3, амидная группа A202 в H-конформации входит в остов 3_{10}-спирали ФСК и в соответствии с типом спирали образует водородную связь с карбонильной группой G199. Длина данной связи по нашим расчетам составляет 3,4±0,1 Å[17)] (по данным рентгеноструктурного анализа – 3 Å [4]), при этом расстояние между атомом амидного азота A202 и экзоциклическим экваториальным атомом кислорода O6 цАМФ по результатам докинга (раздел 3.1.1) составляет ~5,2 Å (рисунки 4.1 А, 4.2 А). Переход в B-конформацию инициируется процессом образования водородной связи с участием этих двух атомов. В результате остаток A202 смещается, связь A202(N-H)–G199(O) разрушается (4,5±0,1 Å), и спираль ФСК переходит из 3_{10}- в α-форму. Достигнутое положение спирали ФСК закрепляется образованием водородной связи A202(O)–T207(N-H) (3,6±0,1 Å) (рисунки 4.1 Б, 4.2 Б).

[17)] Статистически обработанные данные, приведенные в главе 4, подробно объяснены в главе 5.

А. 

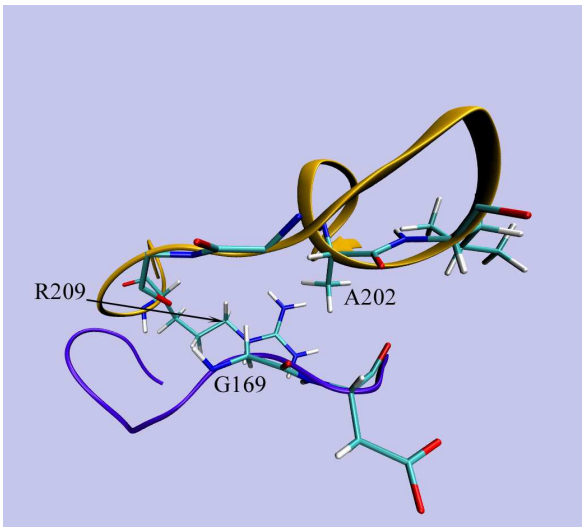
Б. 

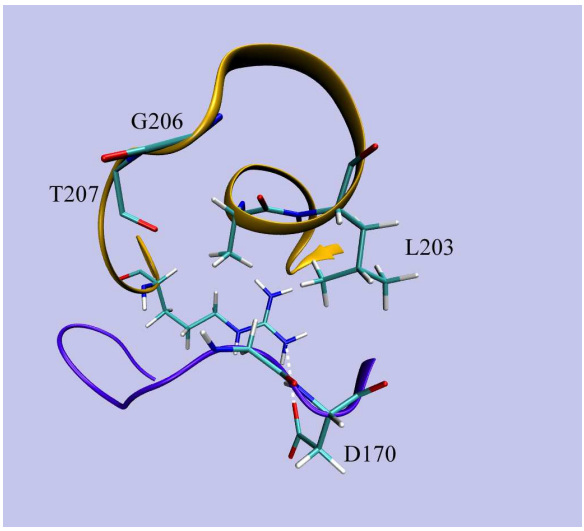
А – Н-конформация; Б – В-конформация. Обозначены расстояния A202(N-H)–G199(O), A202(O)–T207(N-H) и A202(N-H)–цАМФ(O6) обсуждаемые в тексте. β2β3-петля и стабильные участки β-субдомена на рисунке не приведены

Рисунок 4.1 – ФСК А-домена R-субъединицы ПКА Iα

Переход β-субдомена в В-конформацию также сопровождается разрывом двух водородных связей между ФСК и β2β3-петлей: G169(N-H)–G206(O) и G169(N-H)–T207(O) (рисунок 4.2). В Н-конформации длины этих связей равны 3,9±0,14 Å и 3,5±0,1 Å, а в В-конформации расстояния между соответствующими атомами увеличиваются до 6,9±0,14 Å и 4,9±0,1 Å. Таким образом, в В-конформации расстояние между ФСК и β2β3-петлей существенно больше, чем в Н-конформации.

Реорганизация спирали ФСК, очевидно, приводит к изменению положения и других остатков ФСК, среди которых наиболее важен L203. В результате смещения L203 его боковая цепь оказывается над β2β3-петлей и приобретает возможность «упаковываться» в гидрофобный карман, образованный этой петлей и ФСК (рисунок 4.2 Б). Существование искомого кармана во всех конформациях домена является следствием изгиба β2β3-петли (рисунок 4.2), который поддерживается CH-π-взаимодействием между атомом водорода при Cα-атоме углерода G169 и гуанидиновой группой R209 [52]. «Упаковывание» L203 в гидрофобный карман сопровождается увеличением энергии взаимодействия между L203 и аминокислотными остатками, образующими данный карман, − G169, D170 и N171. До «упаковывания» она составляет 0,2±0,1 ккал/моль, а после «упаковывания» − -3,2±0,1 ккал/моль.

А. 

Б. 

А – Н-конформация; Б – В-конформация. Оранжевым цветом выделена ФСК, лиловым – β2β3-петля. Показан перенос боковой цепи A202 над метиленовой группой G169, «упаковывание» L203 в гидрофобный карман и образование ионной связи между боковыми цепями D170 и R209. цАМФ и стабильные участки β-субдомена на рисунке не приведены

Рисунок 4.2 – Часть структуры β-субдомена А-домена R-субъединицы ПКА Iα

В ходе моделирования β-субдомена нам удалось продемонстрировать образование в В-конформации ионной связи между боковыми цепями D170 и R209 (рисунок 4.2 Б). Очевидно, эта связь стабилизирует В-конформацию, однако активное участие электростатического «переключателя» R209–D170–R226 в конформационном переходе А-домена (подробное описание «переключателя» приведено в главе 1) проведенные нами расчеты не подтвердили. Детальному рассмотрению вопроса функционирования искомого «переключателя» посвящены пятая и частично шестая главы настоящей диссертации.

Важной характеристикой конформационного перехода любого белка, является энергетический барьер, разделяющий его конечные конформации. Однако примененные в диссертации методы не позволяют даже грубо оценить высоту этого барьера. Представляется возможным только предположить, с какими структурными особенностями белка может быть связано его существование. В случае β-субдомена наличие барьера, вероятно, определяется переносом боковой цепи A202 над метиленовой группой G169. В Н-конформации боковая цепь A202 располагается «справа» от искомой метиленовой группы (рисунок 4.2 А), а в В-конформации занимает место «слева» от нее (рисунок 4.2 Б), благодаря чему и становится возможным образование водородной связи между амидной группой A202 и атомом O6 цАМФ. То, что перенос боковой цепи A202 над метиленовой группой G169 сопровождается преодолением энергетического барьера, в некоторой степени подтверждается консервативностью (почти инвариантностью) остатков A202 и G169 во всех известных цАМФ-связывающих доменах.

Важно отметить, что переход β-субдомена А-домена из Н- в В-конформацию был нами продемонстрирован и в отсутствие цАМФ (подробнее об этом в главе 5). Этот результат требует объяснений, так как очевидно, что смещение амидной группы А202 по направлению к экзоциклическому экваториальному атому кислорода О6 цАМФ предполагает наличие цАМФ в связывающем сайте. Мы считаем, что в отсутствие цАМФ движущей силой конформационных изменений домена является переход спирали ФСК в энергетически более выгодную α-форму, а смещение амидной группы А202 сопутствует этому процессу. Взаимодействие с С-субъединицей препятствует самопроизвольному изменению конформации А-домена, и в таком случае связывание лиганда становится единственным возможным путем достижения В-конформации.

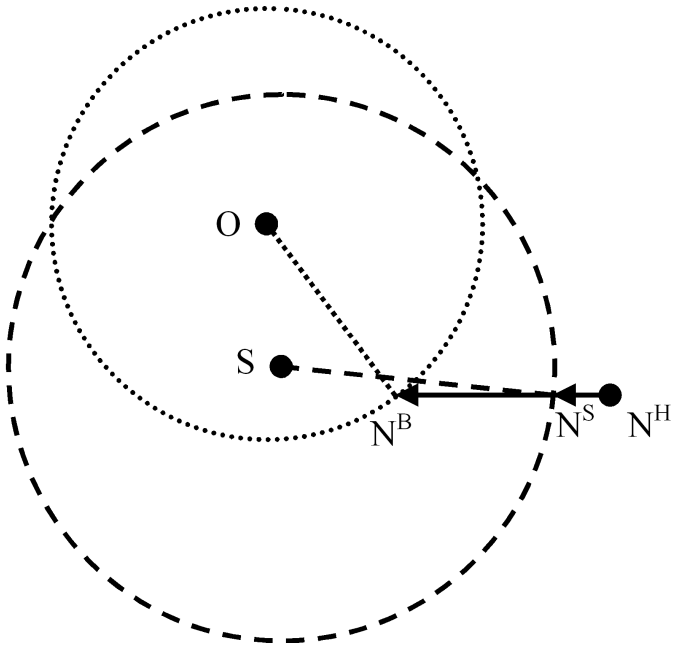
4.2. Взаимодействие Rp-цAMPS с цАМР-связывающим сайтом В-домена[18] ПКА Iα

Взаимодействие Rp-цАМФS с цАМФ-связывающим сайтом В-домена анализировалось на основе данных, полученных методом докинга (разделы 3.1.1 и 3.1.3), квантово-химических расчетов (раздел 3.1.4), а также показанного в разделе 4.1 смещения амидной группы остатка А202 (А326 для В-домена).

Представить наглядно все полученные результаты позволяет приведенная в данном разделе схема (рисунок 4.3), на которой отмечены экзоциклические экваториальные атомы кислорода цАМФ О6 и серы Rp-цАМФS S1 (на рисунке О и S), а также возможные положения азота амидной группы А326 (N^H, N^B и N^S) (см. пояснения к рисунку 4.3). На рисунке атомы кислорода и серы изображены на некотором расстоянии друг от друга, что является иллюстрацией результатов, полученных методом докинга (разделы 3.1.1 и 3.1.3) и указывающих

[18] Механизм ингибирующего действия серузамещенного аналога цАМФ (Rp-цАМФS) на активацию ПКА Iα рассматривался на примере В-домена, в то время как все данные, полученные методом молекулярной динамики и приведенные в настоящей диссертации, представляют собой исследования А-домена. Это несоответствие связано с тем, что докинг Rp-цАМФS был проведен только в связывающие сайты В-домена, и повторить его на А-домене не представляется возможным вследствие окончания срока действия лицензии программы докинга Quantum 3.3.0. Однако есть веские основания полагать, что данные, полученные на одном домене, могут быть без изменений перенесены на другой домен, если речь идет о процессах, происходящих в β2β3-петле и ФСК. Действительно, все аминокислотные остатки, выделенные нами как ключевые в А-домене, присутствуют также и в В-домене, а наложение друг на друга третичных структур А- и В-доменов как в Н-, так и в В-конформациях в области β-субдомена дает практически идеальное совпадение координат аналогичных атомов (RMSD < 1Å). Кроме того, не включенное в данную работу моделирование В-домена методом молекулярной динамики подтвердило, что конформационные изменения ФСК в обоих доменах протекают одинаково. Таким образом, наши данные, полученные на А-домене, несущем делеции N3A-мотива и B/C-спирали, вполне могут быть использованы для анализа событий, происходящих в цАМФ-связывающем сайте В-домена.

на различия в положениях цАМФ и Rp-цАМФS в связывающем сайте B-домена в H-конформации.



Точками O и S показано положение экваториальных атомов кислорода и серы лигандов, определенное методом докинга цАМФ и Rp-цАМФS соответственно в связывающий сайт B-домена в H-конформации. Способность искомых атомов кислорода и серы образовывать отличающиеся по длине водородные связи с амидной группой белка, обозначена с помощью окружностей разных радиусов. Точки N^H и N^B соответствуют положениям атома азота амидной группы A326 в H- и B-конформациях, а вектор N^HN^B – направлению движения данного атома при переходе из одной конформации в другую. Точкой N^S отмечено предполагаемое положение атома азота при связывании B-домена в H-конформации с Rp-цАМФS. Масштаб не соблюден

Рисунок 4.3 – Схема, объясняющая предложенную в работе модель Rp-цАМФS-зависимого ингибирования конформационного перехода B-домена ПКА Iα

В том случае, если в цАМФ-связывающем сайте находится цАМФ, атом азота амидной группы A326 при конформационном переходе смещается из точки N^H в точку N^B. В H-конформации (точка N^H) расстояние между данным атомом азота и экзоциклическим экваториальным атомом кислорода цАМФ O6 равно 5,4 Å. В B-конформации, когда атом азота находится в точке N^B, искомое расстояние уменьшается до 3,0 Å. Именно при таком расстоянии по результатам квантово-химических расчетов (раздел 3.1.4) водородная связь между амидной группой A326 и экваториальным атомом кислорода цАМФ характеризуется максимальной энергией связывания.

Для Rp-цАМФS в H-конформации расстояние между атомом азота амидной группы A326 (находится в точке N^H) и экзоциклическим экваториальным атомом серы Rp-цАМФS S1 равно 4,7 Å. В то же время, исходя из результатов квантово-химических расчетов (раздел 3.1.4),

максимальная энергия водородной связи достигается при расстоянии между искомыми атомами равном 3,9 Å. Для выполнения этого условия атом азота должен сместиться в точку N^S, и дальнейшее его смещение будет энергетически невыгодным. Так, если допустить смещение атома азота из точки N^S в точку N^B расстояние между атомами серы и азота уменьшится от 3,9 до 2,0 Å и станет меньше суммы вандерваальсовых радиусов этих атомов. Ответом на сопутствующее возрастание энергии системы станет возвращение атома азота в точку N^S.

Таким образом, Rp-цАМФS, находясь в цАМФ-связывающем сайте, позволяет произойти лишь незначительному смещению амидной группы A326, недостаточному для перехода B-домена из H- в B-конформацию, в результате чего B-домен оказывается блокированным в H-конформации. Очевидно, что при таком механизме действия Rp-цАМФS не только не индуцирует переход B-домена в B-конформацию, но и уменьшает вероятность его самопроизвольного протекания, что, на наш взгляд, и является основой для проявления Rp-цАМФS свойств обратного агониста ПКА Iα.

К сожалению, непосредственное моделирование предложенного нами механизма действия Rp-цАМФS пока остается неосуществленным. Оно, без сомнения, необходимо для подтверждения сделанных выводов. Однако рассмотренные нами расчетные и экспериментальные (раздел 4.3.2) данные с большой долей вероятности позволяют судить в пользу предложенной здесь модели.

4.3. Обсуждение результатов

4.3.1. Переход A-домена ПКА Iα в B-конформацию запускается смещением амидной группы A202

С использованием методов молекулярного моделирования нам удалось установить, что ключевым событием, инициируемым цАМФ при связывании с A-доменом ПКА Iα, является образование водородной связи между амидной группой A202 и экзоциклическим экваториальным атомом кислорода O6 цАМФ. Движение амидной группы A202, без которого невозможно образование этой связи, приводит к переходу короткой 3_{10}-спирали ФСК в более длинную α-спираль, а в итоге к смещению остатка L203 и «упаковыванию» его боковой цепи в гидрофобный карман, образованный фрагментами ФСК и β2β3-петли. Последнее событие, как предполагается [30, 33], является начальной стадией работы гидрофобного «переключателя» (см. раздел 1.3.2). Оно приводит к повороту B-спирали и передает таким образом конформационные изменения в цАМФ-связывающем сайте на отдаленные от лиганда структуры белка. В свете этих данных роль электростатического «переключателя» R209–D170–R226 в конформационном переходе цАМФ-связывающих доменов представляется вспомогательной.

Подробней этот вопрос рассмотрен в главе 5.

Ключевая роль смещения амидной группы A202 (A326) в конформационном переходе цАМФ-связывающих доменов согласуется с построенной нами моделью, объясняющей проявление лигандом Rp-цАМФS свойств обратного агониста ПКА Iα. Согласно этой модели Rp-цАМФS препятствует смещению амидной группы A326 (A202), наблюдаемому при переходе цАМФ-связывающих доменов из H- в B-конформацию, и блокирует таким образом начальные этапы работы гидрофобного «переключателя». В соответствии с предложенной гипотезой связывание Rp-цАМФS, как и цАМФ, сопровождается образованием водородной связи между экзоциклическим экваториальным атомом серы Rp-цАМФS и амидной группой A326 (A202), однако параметры этой связи в совокупности с положением атома серы делают движение A326 (A202) невозможным. В результате Rp-цАМФS-связанный домен оказывается «запертым» в H-конформации.

Изложенные в этой главе результаты подтверждаются данными, полученными методом рентгеноструктурного анализа [5] и представляющими собой исследование Rp-цАМФS-связанного RC комплекса. В построенной на основе этих данных трехмерной модели (PDB ID 3PLQ) между амидной группой A202 и экзоциклическим экваториальным атомом серы S1 Rp-цАМФS реализована водородная связь длиной 3,4 Å, но при этом A-домен находится в H-конформации. Этот факт полностью согласуется с нашими результатами, однако именно он, на наш взгляд, не дал исследователям понять ключевую роль смещения остатков A202 (A326) в переходе цАМФ-связывающих доменов из H- в B-конформацию. Действительно, пока не удалось экспериментальными методами получить комплекс, представляющий собой цАМФ-связывающий домен в H-конформации и при этом содержащий агонист (например, цАМФ) в связывающем сайте. А, исходя из наших данных, только такие комплексы характеризуются отсутствием водородной связи между амидной группой A202 (A326) и лигандом[19]. В то же время те лигандсвязанные комплексы, которые успешно кристаллизуются, либо представляют собой домен в B-конформации, либо, как упомянуто выше, с доменом в H-конформации связан Rp-цАМФS. И в том и в другом случае на момент экспериментальных наблюдений образование водородной связи между экзоциклическим экваториальным атомом кислорода или серы лиганда и амидной группой A202 (A326) в этих комплексах уже завершилось. Таким образом, до настоящего времени негласно полагалось, что искомая связь формируется сразу при связывании

[19] На самом деле, как следует из наших данных, Rp-цАМФS, образуя комплекс с цАМФ-связывающим доменом в H-конформации, так же, как агонисты, не формирует водородной связи с амидной группой A202 (A326). Однако для того чтобы эта связь реализовалась, необходимы незначительные изменения конформации белка. Совершив эти изменения, домен не выходит из ансамбля H-конформаций. Поэтому формулировка о реализации искомой водородной связи между Rp-цАМФS и доменом, находящимся в H-конформации, является корректной.

цАМФ, как и другие взаимодействия, удерживающие лиганд в сайте (см. раздел 1.3.1 или 3.1.1). Внести ясность в понимание этого процесса нам удалось благодаря использованию методов молекулярного моделирования.

4.3.2. Экспериментальные подтверждения предложенной модели обратного агонизма Rp-цАМФS

Предложенная нами модель, объясняющая обратный агонизм Rp-цАМФS, существенно отличается от всех предложенных ранее моделей. Во-первых, в литературе предполагается, что Rp-цАМФS среди всех конформаций цАМФ-связывающего домена отбирает H-конформацию [5]. Мы же считаем, что Rp-цАМФS обладает достаточным сродством к B-конформации, чтобы переход в нее характеризовался отличной от нуля вероятностью. Во-вторых, многие исследователи видят причину обратного агонизма Rp-цАМФS в блокировании конформационного перехода путем разобщения электростатического «переключателя» R209–D170–R226 [58, 65]. Напротив, в соответствии с нашей моделью Rp-цАМФS препятствует работе не электростатического, а гидрофобного «переключателя». В связи с приведенными расхождениями вопрос экспериментальных фактов, обосновывающих предложенную нами модель, стоит особо остро. В данном разделе диссертации мы рассмотрим факты, свидетельствующие в пользу формирования Rp-цАМФS стабильных комплексов, как с H-, так и с B-конформацией цАМФ-связывающего домена. Факты, доказывающие, что электростатический «переключатель» не играет ключевой роли в конформационном переходе цАМФ-связывающих доменов, будут рассмотрены в главе 5.

В 2004 году были впервые получены и расшифрованы кристаллические структуры комплексов Δ(1–91) R-субъединиц ПКА Iα с Rp-цАМФS и Sp-цАМФS [27]. Оказалось, что эти комплексы мало отличаются друг от друга и от аналогичного комплекса с цАМФ. Во всех трех случаях оба цАМФ-связывающих домена R-субъединицы находились в B-конформации. Позднее, в 2011 году, удалось получить комплекс Δ(1–90)Δ(245–379) R-субъединицы ПКА Iα (A-домен) с Rp-цАМФS, находящийся в H-конформации [5]. Сравнение методик двух названных экспериментов позволяет сделать следующее наблюдение. В эксперименте 2004 года комплексы R-субъединиц с цАМФ не подвергали денатурации для удаления присутствующих в связывающих сайтах лигандов, а просто использовали вместо цАМФ цГМФ, который, в отличие от цАМФ, как считалось ранее, можно легко удалить диализом. Однако впоследствии было показано, что после диализа A-домен R-субъединицы остается занятым лигандом и оба цАМФ-связывающих домена находятся в B-конформации, причем B-конформация B-домена, вероятно, стабилизируется лигандом в A-сайте [106]. В эксперименте 2011 года Rp-цАМФS добавляли не к свободной R_A субъединице, а к R_AC комплексу, в котором, как известно, A-домен R-

субъединицы находится в H-конформации. Иными словами в первом эксперименте Rp-цАМФS связывался с белком, который уже был в B-конформации, и получившийся комплекс представлял собой B-конформацию. Во втором эксперименте белок существовал в H-конформации, и добавление Rp-цАМФS также не изменяло это состояние.

Важная группа результатов, характеризующая строение Rp-цАМФS-связанных комплексов R-субъединиц, была получена методами ЯМР [105, 31], спектрометрии ионной подвижности / масс спектрометрии [5] и исследования изменения свободной энергии при индуцированном мочевиной анфолдинге [7]. С использованием этих методик было выявлено, что Rp-цАМФS-связанные комплексы как Δ(1–91), так и Δ(1–90)Δ(245–379) R-субъединиц более всего по своим характеристикам похожи на соответствующие свободные R-субъединицы. А, исходя из экспериментальных данных, H- и B-конформации A-домена у названных свободных R-субъединиц заселены примерно в равной мере [31]. Только в одной работе методами анфолдинга и ЯМР было продемонстрировано, что процент H-конформаций у Rp-цАМФS-связанной RIα(91-244) субъединицы выше, чем у свободной RIα(91–244) субъединицы, но ниже, чем в R_AC комплексе [31]. На возможном объяснении полученных в данной работе результатов мы остановимся далее, однако и эти результаты не мешают сделать вывод о возможности связывания Rp-цАМФS как с H-, так и с B-конформациями цАМФ-связывающих доменов.

Наконец, последняя группа результатов, на которую мы опираемся в своих рассуждениях, – экспериментально показанная активация ПКА Iα с помощью Rp-цАМФS. Очевидно, что Rp-цАМФS ведет себя как агонист ПКА Iα далеко не при всех условиях. Чтобы Rp-цАМФS мог хотя бы частично активировать ПКА Iα необходимы либо избыток субстрата [34], либо присутствие в цАМФ-связывающем сайте A-домена мутаций, препятствующих связыванию лигандов [34, 64]. Как уже обсуждалось в разделе 3.5.4, в обоих названных случаях Rp-цАМФS предположительно фиксирует предсуществующую B-конформацию B-домена, а последующая диссоциация R- и C-субъединиц происходит спонтанно. В этой связи стоит отметить, что Rp-цАМФS при тех же условиях не является агонистом ПКА IIβ, возможно, именно потому, что B-домен ПКА IIβ, в отличие от ПКА Iα, находится преимущественно в H-конформации [71].

Таким образом, многочисленные данные свидетельствуют в пользу того, что Rp-цАМФS обладает сродством как к H- так и к B-конформациям цАМФ-связывающих доменов, причем сродство к B-конформации, вероятно, выше, чем к H. Это предположение находит подтверждение не только в наших результатах, полученных методом докинга (раздел 3.1.3), но и в простом рассуждении. Действительно, какой бы механизм ни лежал в основе антагонизма Rp-цАМФS, он не распространяется на переход домена из B- в H-конформацию, так как этот переход не зависит от лигандов. Тогда, если предположить, что комплекс цАМФ-связывающего

домена с Rp-цАМФS в H-конформации более выгоден по энергии, чем соответствующий комплекс в B-конформации, последний комплекс должен переходить в первый. Однако это не происходит, о чем свидетельствуют и данные рентгеноструктурного анализа [27], и исследования агонизма Rp-цАМФS [34, 64]. Иными словами цАМФ-связывающий домен в комплексе с Rp-цАМФS, находясь в B-конформации, представляет собой термодинамически выгодную стабильную структуру.

В то же время нельзя оставить без внимания тот факт, что при равных частотах H- и B-конформаций Rp-цАМФS либо взаимодействует с обеими с равной вероятностью, либо отдает предпочтение H-конформации. Мы полагаем, что это связано с кинетическими факторами, то есть предположительно с большей константой скорости связывания Rp-цАМФS с H-конформацией. Вероятно, другие лиганды, в том числе и цАМФ, также оказывают кинетическое предпочтение H-конформации. Однако агонисты тут же вызывают переход домена в B-конформацию, а Rp-цАМФS препятствует ему. Таким образом, равновесие между конформациям смещается в первом случае в сторону B-конформации, а во втором случае в сторону H.

4.4. Промежуточные выводы

1) Смещение амидной группы A202(A326) является механизмом, запускающим конформационный переход цАМФ-связывающих доменов.

2) Механизм, лежащий в основе поведения Rp-цАМФS как обратного агониста ПКА Iα, заключается в препятствии смещению искомой амидной группы, а следовательно, в блокировании перехода доменов из H- в B-конформацию.

3) «Упаковывание» аминокислотного остатка L203 в гидрофобный карман, образованный участками ФСК и β2β3-петли, является одним из главных результатов смещения амидной группы A202(A326). Это событие, вероятно, служит начальной стадией работы гидрофобного «переключателя» L203–Y229 и запускает процесс передачи конформационных изменений с цАМФ-связывающего сайта на отдаленные от лиганда структуры белка.

4) Электростатический «переключатель» R209–D170–R226, по всей видимости, играет вспомогательную роль в конформационном переходе цАМФ-связывающих доменов.

5. АМИНОКИСЛОТНЫЙ ОСТАТОК В ПОЛОЖЕНИИ 209 КАК ФАКТОР СТАБИЛИЗАЦИИ B-КОНФОРМАЦИИ А-ДОМЕНА ПКА Iα

Согласно литературным данным аргинин в 209-ом положении не только участвует в связывании лиганда, образуя с ним водородную связь, но и является частью электростатического «переключателя» R209–D170–R226, которому отводится ключевая роль в передаче конформационных изменений цАМФ-связывающего сайта на отдаленные от лиганда структуры белка (подробнее раздел 1.3.2) [5, 32, 65, 105]. Этот механизм считают основой конформационного перехода А-домена а, следовательно, и активации ПКА Iα. Особая важность аргиина в положении 209 подтверждается его инвариантностью в эволюции, а также тем, что замена аргинина на схожий по свойствам лизин практически полностью блокирует переход домена в B-конформацию и повышает константу активации ПКА Iα более чем на порядок [69, 70]. Тем не менее в главе 4 мы уже отмечали, что такая точка зрения не вполне согласуется с нашими результатами и встречает серьезное противоречие со стороны экспериментальных данных. Среди них, несомненно, особое значение имеет тот факт, что домены с точечными заменами R209I и R209T практически не отличаются по свойствам от белков дикого типа, хотя электростатический «переключатель» у них разобщен [34]. Нам представляется, что аргинин в 209-ом положении действительно важен для активации ПКА Iα, однако по крайней мере ряд его важных функций не реализуются посредством электростатического «переключателя» R209–D170–R226. Проверке этой гипотезы и попытке установления истинной роли R209 посвящена пятая глава настоящей диссертации.

В качестве системы для проведения моделирований в главах 5 и 4 используется β-субдомен А-домена ПКА Iα (дикого типа или с точечными заменами R209). Отказ от учета α-субдомена вызван необходимостью уменьшить время расчетов, что подробно обсуждается в разделе 2.3. Однако моделирование β-субдомена не является общепринятой методикой исследования цАМФ-связывающих доменов, поэтому в главе 5 также анализируется пригодность такой модели для изучения конформационной динамики соответствующего цАМФ-связывающего домена.

5.1. Описание конформаций, принимаемых β-субдоменом А-домена ПКА Iα

По результатам моделирования и обработки полученных результатов методом кластерного анализа (раздел 2.3.3) нам удалось выделить шесть различных конформаций, характерных для β-субдомена А-домена ПКА Iα. В настоящей главе показано, что заселенность этих конформаций зависит от того, какой остаток находится в положении 209. Однако вероятно, что их устойчивость определяется и другими, не выявленными пока факторами. Средние значения всех параметров, использованных для характеристики конформаций β-субдомена, (подробнее раздел 2.3.3) приведены в таблице 5.1.

B-конформация (рисунок 5.1 А) была выделена нами среди совокупности кластеров как конформация с минимальным значением $RMSD_B$ и большим значением $RMSD_H$. Значения других параметров также учитывались и подтверждали, что мы имеем дело именно с B-конформацией, известной по результатам рентгеноструктурного анализа [5, 6, 27]. B`-спираль выявленной нами конформации (названия элементов вторичной структуры цАМФ-связывающего домена приведены в разделе 1.3.1.) находится в α-форме и, как результат, водородная связь G199(O)–A202(N), характерная для 3_{10}-спирали, оказывается разорванной. Как мы уже обсуждали в главе 4, разрушение этой связи сопровождается смещением амидной группы A202 и имеет решающее значение для образования водородной связи между A202 и лигандом. Водородная связь A202(O)–T207(N) присутствует в рассматриваемой конформации, так как стабилизирует C-конец B'-спирали в ее α-форме, а водородная связь G199(O)–L203(N), хотя и характерна для α-спирали, отсутствует. Также отсутствуют водородные связи G169(N)–T207(O) и G169(N)–G206(O), которые поддерживают в H-конформации минимальное расстояние между ФСК и β2β3-петлей. Объяснение отсутствию трех названных связей заключается в невозможности их реализации при правильном размещении боковой цепи L203 в гидрофобном кармане, описанном в главе 4. В соответствии с нашими (главы 4 и 6) и экспериментальными данными [30, 33] помещение L203 в этот карман является элементом гидрофобного «переключателя» и лежит в основе механизма конформационного перехода цАМФ-связывающих доменов. Сообразно с важностью этого процесса, L203 в B-конформации всегда «упакован» в гидрофобный карман. В рамках нашей модели этот факт демонстрируется большой энергией взаимодействия между L203 и аминокислотными остатками (G169, D170, и N171), входящими в состав β2β3-петли.

H-конформацию (рисунок 5.1 Б) мы выделили среди совокупности кластеров на основании набора признаков, отличающих по данным рентгеноструктурного анализа A-домен в составе RC комплекса [4, 28, 29]. К этим признакам относятся 3_{10}-форма B`-спирали, минимальное расстояние между ФСК и β2β3-петлей и отсутствие «упаковки» боковой цепи L203 в гидрофобный карман. Присутствие в выявленной нами конформации таких черт строения подтверждается значениями параметров, приведенными в таблице 5.1. Неожиданностью для нас оказалось то, что исследуемая конформация хотя и характеризуется минимальным среди всех конформаций значением $RMSD_H$ и максимальным значением $RMSD_B$, однако существенно отличается по этим параметрам от A-домена в составе RC комплекса. Это несоответствие, на наш взгляд, должно отражать важную роль C-субъединицы в оптимизации H-конформации. Иными словами та, «истинная», H-конформация, которую принимает A-домен в составе RC комплекса, в отсутствие C-субъединицы недостижима. Следует отметить, что цАМФ, по-видимому, не играет аналогичной роли в оптимизации B-конформации. Это

утверждение основывается на отсутствии существенных различий между B-конформациями в отсутствие и присутствии лиганда.

Остальные выявленные нами конформации мы разделили на две группы. В первую группу вошли конформации B-типа (B1, B2, B3), как похожие на B-конформацию, а во вторую - H-типа (H1), как похожие на H-конформацию. Основанием для такого разделения стало положение боковой цепи A202, находящейся в H-конформациях справа от метиленовой группы G169, а в B-конформациях слева от нее (подробнее в главе 4).

Основные различия между B1- (рисунок 5.1 В) и B-конформациями заключаются в небольшом расстоянии между ФСК и β2β3-петлей и образованием водородной связи G199(O)–L203(N), результатом которой является длинная α-спиральная форма B'-спирали. В свете вышеназванных причин правильное размещение боковой цепи L203 в гидрофобном кармане в этой конформации невозможно. Тем не менее, вследствие небольшого расстояния между L203 и β2β3-петлей, наблюдается некоторая минимизация энергии между ними.

B2-конформация (рисунок 5.1 Г) также характеризуется водородной связью G199(O)–L203(N). Однако в этой конформации расстояние между ФСК и β2β3-петлей практически такое же, как в B-конформации. В результате ни упаковывание боковой цепи L203 (как в B-конформации), ни минимизация энергии (как в B1-конформации) не достижимы. Боковая цепь L203 в этой конформации располагается таким образом, что участие ее во взаимодействии между ФСК и B/C-спиралью (L203–Y229) становится маловероятным, а разрушение этого взаимодействия в свою очередь маловероятно в функционирующем цАМФ-связывающем домене. Основываясь на этом наблюдении, мы предположили, что B2-конформация не реализуется в присутствии α-субдомена.

B3-конформация представляет собой среднее состояние между B- и B2-конформациями и, как и B2-конформация, по-видимому, присуща только отдельному β-субдомену.

H1-конформация (рисунок 5.1 Д) может рассматриваться как первый шаг на пути перехода из H- в B-конформацию. Однако как стабильная конформация она существует только для β-субдомена с заменой R209K в отсутствие цАМФ.

5.2. Заселенность конформаций β-субдомена А-домена ПКА Iα

5.2.1. β-субдомен белка дикого типа в комплексе с цАМФ и не связанный с лигандом

При моделировании β-субдомена белка дикого типа в присутствии цАМФ были выявлены B-, B2- и H-конформации в соотношении 25%, 74%, и 1% (рисунок 5.2 А). Состояние β-субдомена в отсутствие цАМФ (рисунок 5.2 Б) описывалось теми же конформациями, но в соотношении 16%, 79%, и 5%.

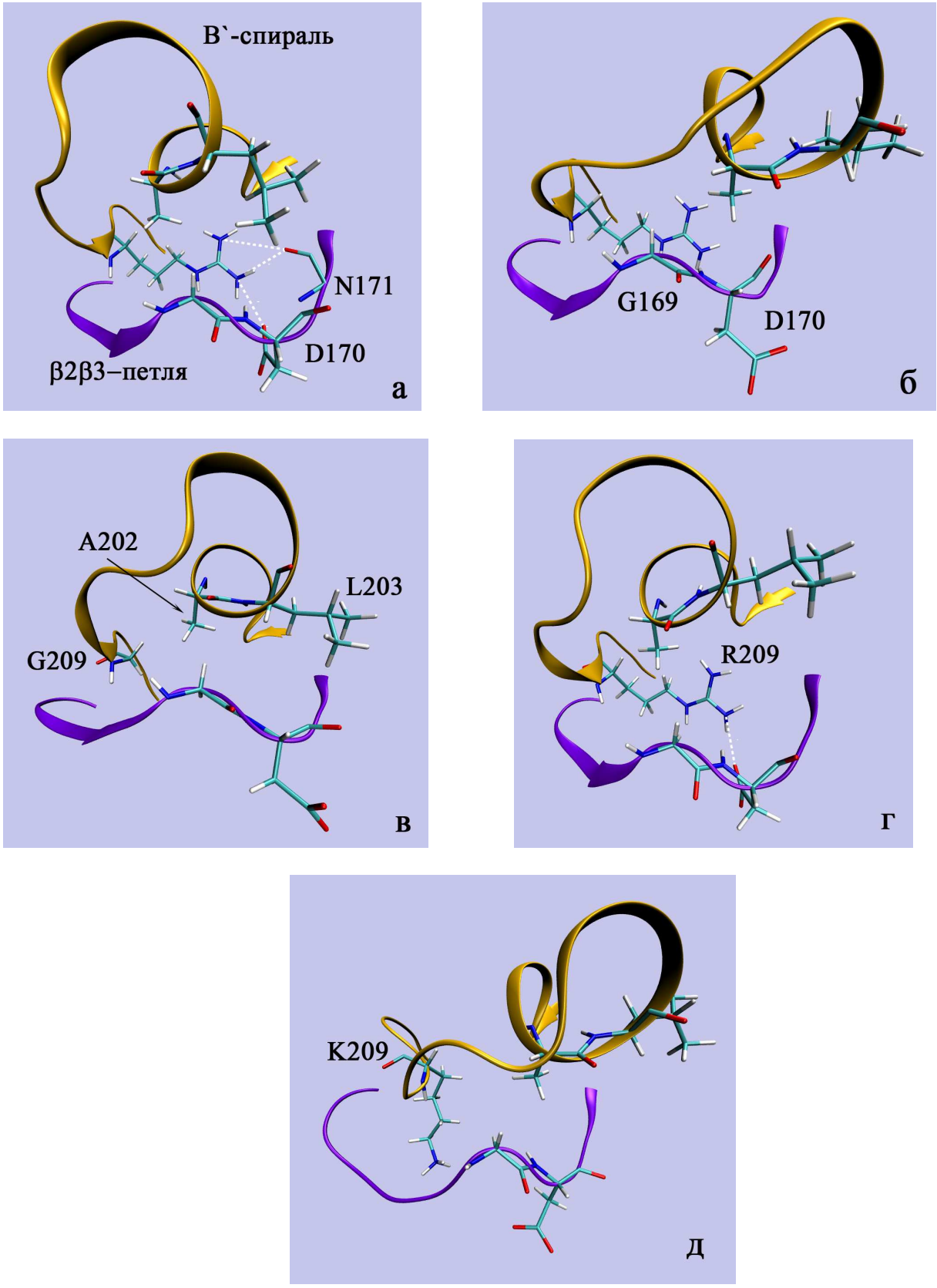
Приведенные результаты подтверждают факт стабилизации B-конформации в присутствии цАМФ. Кроме того, они в совокупности с экспериментальными данными позволяют высказать предположение о стабилизирующем влиянии α-субдомена на H-конформацию A-домена ПКА Iα. Действительно, согласно данным ЯМР анализа, полученным на A-домене (а. о. 91 – 260), заселенности B- и H-конформаций в отсутствие лиганда равны [31]. Наши результаты, полученные на β-субдомене, указывают на слабое предпочтение к B-конформации (2,9 кДж/моль, исходя из соотношения B- и H-конформаций 16:5). Таким образом, в A-домене ПКА Iα присутствие α-субдомена делает H-конформацию более устойчивой. В случае других цАМФ-связывающих доменов влияние α-субдоменов на стабильность конформаций требует отдельного изучения.

Следует отметить, что в обеих рассмотренных системах в B-конформации реализовывалась водородная связь между боковыми цепями R209 и D170 (рисунок 5.1 A), которая является элементом электростатического «переключателя». В системах, несущих мутации в положении 209, этой связи не существовало ни в одной из конформаций.

Таблица 5.1 – Сравнение конформаций β-субдомена[20]

Параметры	Кластеры (Конформации)					
	B	B1	B2	B3	H1	H
$RMSD_B$, Å	0,8±0,1 [B1***, B2***, H***, H1***]	1,6±0,1 [B***, B2†, B3**, H***]	1,4±0,1 [B***, B1†, B3*, H***, H1*]	0,9±0,2 [B1**, B2*, H***, H1**]	1,8±0,2 [B***, B2*, B3**, H*]	2,2±0,1 [B***, B1***, B2***, B3***, H1*]
$RMSD_H$, Å	3,1±0,1 [B1***, H***, H1*]	2,2±0,15 [B***, B2***, B3***, H*,]	3,3±0,1 [B1***, H***, H1**]	3,5±0,3 [B1***, H***, H1**]	2,4±0,3 [B*, B2**, B3**, H*]	1,7±0,1 [B***,B1*, B2***, B3***, H1*]
Энергия «упаковывания» L203, ккал/моль	-3,2±0,1 [B1***, B2***, B3***, H***, H1***]	-2,4±0,15 [B***, B2***, B3***, H***, H1***]	-0,4±0,1 [B***, B1***, H***]	-0,7±0,3 [B***, B1***, H**, H1†]	0,0±0,3 [B***, B1***, B3†]	0,2±0,1 [B***, B1***, B2***, B3**]
G199(O)–L203(N), Å	4,4±0,1 [B1***, B2***, B3*, H**, H1**]	3,4±0,16 [B***, H*]	3,4±0,1 [B***, H**]	3,8±0,3 [B*]	3,5±0,3 [B**]	3,9±0,1 [B**, B1*, B2**]
G199(O)–A202(N), Å	4,5±0,1 [B1***, B2***, H***, H1***]	3,8±0,1 [B***, B3*, H**, H1†]	3,8±0,1 [B***, B3**, H***, H1†]	4,3±0,2 [B1*, B2**, H***, H1**]	3,4±0,2 [B***, B1†, B2†, B3**]	3,4±0,1 [B***, B1**, B2***, B3***]
A202(O)–T207(N), Å	3,6±0,1 [B2***, H***, H1***]	3,6±0,1 [B2***, H***, H1***]	4,3±0,1 [B***, B1***, H***, H1**]	3,9±0,2 [H***, H1**]	5,0±0,2 [B***, B1***, B2**, B3**]	5,3±0,1 [B***, B1***, B2***, B3***]
G169(N)–T207(O), Å	4,9±0,1 [B1***, H***, H1*]	3,3±0,1 [B***, B2***, B3***, H1**]	4,9±0,1 [B1***, H***, H1**]	5,0±0,2 [B1***, H***, H1*]	4,3±0,2 [B*, B1**, B2**, B3*, H**]	3,5±0,1 [B***, B2***, B3***, H1**]
G169(N)–G206(O), Å	6,9±0,14 [B1***, B2**, H***, H1**]	4,9±0,2 [B***, B2***, B3***, H**]	6,3±0,13 [B**, B1***, H***, H1*]	6,8±0,4 [B1***, H***, H1*]	5,3±0,4 [B**, B2*, B3*, H**]	3,9±0,14 [B***, B1**, B2***, B3***, H1**]

[20] Различия между кластерами показаны в скобках. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, †0,05<p<0,1



А – В-конформация; отмечены водородные связи, образованные боковой цепью R209 с одной стороны и боковой цепью D170 и карбонильной группой N171 с другой стороны. Б – Н-конформация. В – В1-конформация Г – В2-конформация. Д – Н1-конформация. Показаны только β2β3-петля и ФСК

Рисунок 5.1 – Конформации β-субдомена, выявленные с использованием метода кластерного анализа

5.2.2 β-субдомен с точечной заменой R209I в комплексе с цАМФ

Результаты моделирования β-субдомена с точечной заменой R209I продемонстрировали, что изолейцин в 209-ом положении не препятствует реализации B-конформации. Кроме того, боковая цепь I209 образует электростатическое и вандерваальсово взаимодействия с G169, за счет чего поддерживает правильную конформацию β2β3-петли, хотя и уступает в этом аргинину[21]. В то же время отсутствие α-субдомена приводит к увеличению подвижности всех структур белка, включая ФСК и β2β3-петлю, и тем самым усложняет анализ полученных конформаций. Решение этой проблемы было достигнуто путем фиксации β2β3-петли, согласно с методикой, предложенной для β-субдомена белка дикого типа. В свете полученных данных о способности изолейцина в 209-ом положении поддерживать правильную конформацию β2β3-петли, ее фиксация не представляется недопустимым вмешательством в конформационную динамику белка.

Так же как β-субдомен белка дикого типа, β-субдомен с заменой R209I и фиксированной β2β3-петлей находится в состоянии равновесия между тремя конформациями – B, B2 и H в соотношении 54%, 43%, и 3% (рисунок 5.2 B). Первое, что обращает на себя внимание, – это большая заселенность B-конформации, существенно превышающая таковую для β-субдомена белка дикого типа. Мы предполагаем, что причина стабилизирующего влияния I209 на B-конформацию заложена в положении его боковой цепи. Оба остатка (R209 и I209) занимают такие области пространства, что создают благоприятные условия для размещения A202 в положении, характерном для B-конформации, и стабилизируют это положение путем образования взаимодействия с боковой цепью A202. Однако если судить на основании визуальных наблюдений, то изолейцин справляется с этой ролью лучше, чем аргинин.

В то же время изолейцин в 209-ом положении оказывает на B-конформацию и дестабилизирующее влияние. В первую очередь оно связано с невозможностью реализации сильного электростатического взаимодействия между I209 и лигандом. Очевидно, что вероятность потери лиганда из сайта в этом случае увеличивается, а его участие в стабилизации B-конформации становится ограниченным. Тем не менее связь лиганда с сайтом даже в отсутствие этого взаимодействия остается сильной, и нам не удалось пронаблюдать уход цАМФ с поверхности белка. По этой причине влияние данного фактора не нашло отражения в наших результатах. Второй фактор, дестабилизирующий B-конформацию, заключается в недостаточной по сравнению с CH–π взаимодействием фиксации β2β3-петли. Детально он будет рассмотрен в следующих разделах. При моделировании системы с мутационной заменой R209I

[21] Очевидно, что CH–π взаимодействие, поддерживающее правильную конформацию β2β3-петли в домене белка дикого типа, не реализуется, если остаток в 209-ом положении не имеет π-электронной плотности.

нам удалось избежать его влияния, так как β2β3-петля была искусственно зафиксирована.

К обсуждению всех факторов, вносящих часто противоположные вклады в стабилизацию B-конформации, мы вернемся в разделе 5.3.2, однако сейчас отметим, что в соответствии с экспериментальными данными присутствие мутационной замены R209I лишь немногим затрудняет активацию ПКА Iα [34].

5.2.3. β-субдомен с точечной заменой R209E, не связанный с лигандом

β-субдомен с точечной заменой R209E из-за отрицательного заряда боковой цепи глутаминовой кислоты, очевидно, лишен способности связывать цАМФ. цАМФ-индуцированный конформационный переход у него практически не реализуется, что подтверждается экспериментальными данными [34]. Однако не исключено, что остаток глутаминовой кислоты в 209-ом положении может оказывать противоположное воздействие на стабильность B-конформации в отсутствие лиганда. Изучению этого вопроса посвящен текущий раздел диссертации.

Действительно согласно нашим данным, при моделировании β-субдомена с точечной заменой R209E реализуется относительно стабильная B-конформация. А боковая цепь E209 за счет электростатического и вандерваальсова взаимодействия с G169 поддерживает правильное положение β2β3-петли, хотя и уступает в этом изолейцину. Тем не менее как и в опыте с β-субдоменом, несущим замену R209I, анализ полученных конформаций оказывается невозможным без дополнительной фиксации β2β3-петли. Влияние ее положения на стабилизацию B-конформации при использовании такого приема, разумеется, остается без внимания.

Четыре конформации, B, B1 B2 и H (рисунок 5.2 Г)[22], в соотношении 39%, 6%, 7% и 48%, было обнаружено при моделировании β-субдомена с заменой R209E и фиксированной β2β3-петлей. Боковая цепь E209 в конформациях B и B2 смещена с положения, занимаемом аргинином в β-субдомене белка дикого типа, в результате чего боковая цепь A202 оказывается лишенной контактов с E209 и G169. Этот факт негативно отражается на стабильности B и B2 конформаций и приводит к повышению заселенности H-конформации.

В случае реализации конформации B1 для β-субдоменов белка дикого типа или с заменой R209I, боковые цепи остатков в 209-ом и 202-ом положениях были бы расположены в одной и

[22] Представление результатов кластерного анализа дано в пространстве координат PC1 и PC2 (подробнее раздел 2.3.3) для всех систем, кроме системы с заменой R209E. Для нее приведена проекция кластеров на плоскость, образованную факторами PC1 и PC3. Дело в том, что PC3 для β-субдомена с заменой R209E и PC2 для остальных систем – это один и тот же фактор. Собственные числа, соответствующие факторам PC2 и PC3, для всех систем почти равны, и в случае R209E PC2 и PC3 меняются местами.

той же области пространства и стерически мешали друг другу. Однако для домена с мутационной заменой R209E B1-конформация становится стабильной. В этой системе небольшое расстояние между ФСК и β2β3-петлей, характерное для B1-конформации, позволяет восстановить контакты между боковыми цепями A202, E209 и G169.

5.2.4. β-субдомен с точечной заменой R209G, не связанный с лигандом

Изолейцин и глутаминовая кислота в 209-ом положении оказались в некоторой степени способным поддерживать правильную конформацию β2β3-петли. Однако мы предположили, что недостаточная ее фиксация этими остатками приводит к дестабилизации B-конформации. Чтобы проверить эту гипотезу, а также более подробно изучить влияние положения β2β3-петли на заселенность конформаций β-субдомена, мы предприняли исследование β-субдомена с точечной заменой R209G. Глицин в 209-ом положении, очевидно, не мог стабилизировать конформацию β2β3-петли из-за отсутствия боковой цепи.

Как и было предположено, в ходе моделирования такой системы стабильная B-конформация не образовывалась. β2β3-петля в отсутствие стабилизирующих факторов оказалась конформационно подвижным элементом вторичной структуры β-субдомена. Она существовала в виде ряда конформаций, однако только в одной из них (той, что обнаруживается в кристаллических структурах цАМФ-связывающих доменов) одновременно возникал гидрофобный карман для «упаковывания» боковой цепи L203 и создавались благоприятные условия для того, чтобы A202 мог преодолеть барьер над G169 и занять положение, свойственное B-конформации. Когда правильный изгиб β2β3-петли достигался случайно, конформация очень близкая к B появлялась на короткое время, а затем быстро разрушалась, сопровождаемая изменением положения β2β3-петли.

Тем не менее отсутствие в предложенном эксперименте стабильной B-конформации могло быть не только следствием несохранения изгиба β2β3-петли, но и ответом на разрушение других взаимодействий, в которых боковая цепь 209-ого остатка принимает участие. Для уточнения фактора, дестабилизирующего B-конформацию, мы зафиксировали β2β3-петлю и повторили моделирование. В результате было обнаружено четыре конформации: B, B1 B2, и H (рисунок 5.2 Д) в соотношении 26%, 8%, 22% и 44%. Появление стабильной B-конформации свидетельствовало в пользу важной роли положения β2β3-петли в ее реализации и поддержании. В то же время низкая заселенность B- и B2-конформаций, сдвиг равновесия в сторону H-конформации и появление B1-конформации, как и в случае β-субдомена с заменой R209E, были следствием потери контактов между боковыми цепями A202, G209 и G169. В данном случае причиной потери этих контактов являлось не измененное положение боковой цепи остатка в 209-ом положении, а ее отсутствие.

5.2.5. β-субдомен с точечной заменой R209K, не связанный с лигандом

Лизин, как и аргинин, является осно́вной аминокислотой и должен связывать кислые лиганды (как-то цАМФ) с большой аффинностью. Однако замена в 209-ом положении аргинина на лизин практически полностью блокирует переход домена в B-конформацию, снижает его сродство к лиганду и повышает константу активации ПКА Iα более чем на порядок [69, 70, 107]. Чтобы объяснить такое поведение лизина в 209-ом положении мы предприняли два моделирования домена с заменой R209K: в отсутствие и присутствии цАМФ. Результаты первого приведены в этом разделе, а второго – в разделе 5.2.6.

По результатам моделирования в отсутствие цАМФ было обнаружено, что лизин в 209-ом положении не поддерживает правильную конформацию β2β3-петли, и стабильная B-конформация в этой системе не реализуется. Более того, боковая цепь K209 уходит с поверхности цАМФ-связывающего сайта и образует электростатическое взаимодействие с боковой цепью одного из кислых аминокислотных остатков, расположенных в β2β3-петле (D167, E168 или D170). Последний факт представляет особый интерес, так как лизин схож по ряду физико-химических свойств с аргинином и ожидается, что поведение этих остатков в цАМФ-связывающем сайте тоже должно быть схожим. Как видно из приведенных результатов, такое ожидание не оправдано.

Чтобы уточнить фактор, дестабилизирующий B-конформацию, в системе с заменой R209K, мы, в соответствии с использованной в предыдущих разделах методикой, зафиксировали положение β2β3-петли и повторили моделирование. В результате было получено пять различных конформаций β-субдомена: B, B1 B2, H1 и H с заселенностями 14%, 12%, 24%, 22%, и 28% соответственно. Как и в опыте с β-субдоменом с заменой R209G присутствие стабильной B-конформации свидетельствовало в пользу ее зависимости от положения β2β3-петли. А низкая заселенность B-конформации, сдвиг равновесия в сторону H-конформации и появление B1-конформации были ответом на нарушение взаимодействия между боковыми цепями A202 и K209. Оказалось, что область, занимаемая боковой цепью A202 в B-конформации, частично перекрывается с областью, занимаемой CH2 группой в β-положении боковой цепи K209. В B1- и B2-конформациях этого дестабилизирующего фактора не существовало.

В случае реализации H1-конформации для β-субдомена белка дикого типа, боковые цепи A202 и R209 находились бы в одной и той же области пространства и стерически мешали друг другу. Однако в системах с заменами R209I, R209E, R209G и R209K (в отсутствие лиганда) остаток в 209-ом положении не препятствует образованию H1-конформации. Причина, по которой H1-конформация становится стабильной только в случае β-субдомена с заменой R209K пока остается неизвестной. Вероятно, она лежит в образовании выгодных взаимодействий

между боковыми цепями A202 и K209.

5.2.6. β-субдомен с точечной заменой R209K в комплексе с цАМФ

Несмотря на фиксацию β2β3-петли, только B2- и H-конформации в соотношении 72%, и 28% были обнаружены при моделировании цАМФ-связанного β-субдомена с заменой R209K (рисунок 5.2 Ж). B-конформация присутствовала в этой системе, но в следовых количествах, и нам не удалось выделить ее в качестве отдельного кластера.

Причины особого влияния K209, образующего связь с цАМФ, на стабильность B-конформации рассмотрены в данном разделе диссертации.

Боковая цепь R209 крепко фиксирована в цАМФ-связывающем сайте благодаря нескольким взаимодействиям. Эти взаимодействия присутствуют во всех конформациях и поддерживают стабильное во времени положение R209. Два из них представлены водородными связями между боковой цепью R209 и карбонильной группой N171 (рисунок 5.1 А), а третье – CH-π взаимодействием, рассмотренным в предыдущих разделах. В соответствии с результатами, изложенными в разделе 5.2.5, K209 не может компенсировать отсутствие CH-π взаимодействия за счет электростатических и вандерваальсовых взаимодействий, как это происходит у β-субдомена с заменой R209I. Более того, боковая цепь лизина короче, чем у аргинина, и стабильных водородных связей между ней и карбонильной группой N171 не образуется. Вследствие названных причин, боковая цепь лизина в 209-ом положении отличается большой подвижностью в цАМФ-связывающем сайте. Она может формировать нестабильные водородные связи с карбонильными группами N171 или G169, не образовывать водородных связей ни с одним из аминокислотных остатков или же (в отсутствие отрицательно заряженных ионов в цАМФ-связывающем сайте) взаимодействовать с отрицательно заряженными боковыми цепями аминокислотных остатков β2β3-петли. Последняя из перечисленных ситуаций описана в разделе 5.2.5 и вряд ли имеет большое биологическое значение: согласно данным рентгеноструктурного анализа цАМФ-связывающий сайт всегда занят [4], если не лигандом, то низкомолекулярными отрицательно заряженными ионами.

В том случае если боковая цепь лизина остается связанной с лигандом, то ее нестабильное состояние приводит к одному из следующих последствий.

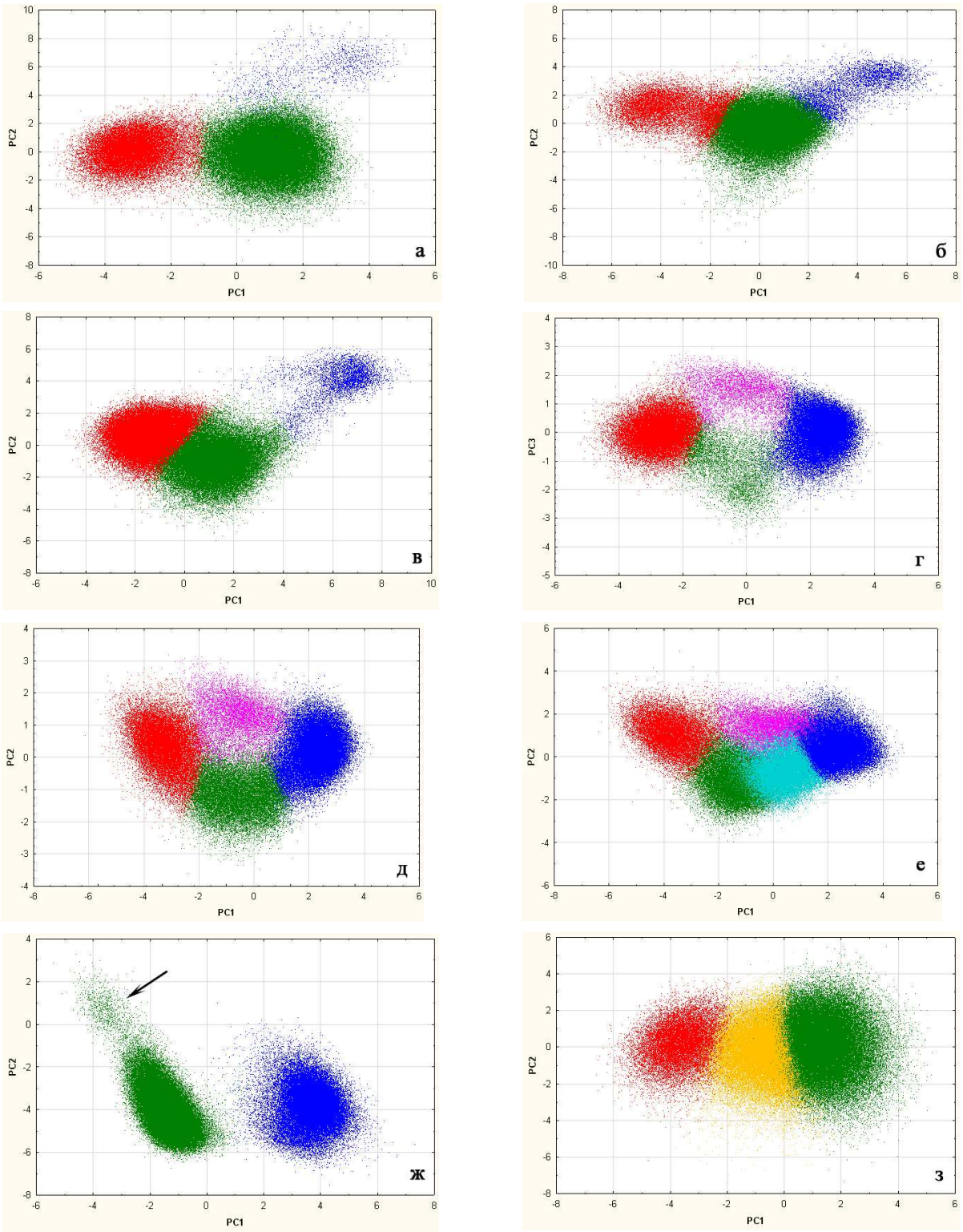
Первое последствие состоит в том, что подвижная боковая цепь K209 постоянно создает стерические препятствия для боковой цепи A202, затрудняя таким образом как стабилизацию B-конформации, так и переход в нее.

Второе последствие заключается в неспособности K209 обеспечить правильную и достаточную фиксацию лиганда в цАМФ-связывающем сайте. В результате водородные связи между лигандом и аминокислотными остатками G199 и A210 разрываются, и лиганд уходит с

поверхности белка. Такой исход мы многократно наблюдали в ходе моделирования. Также следствием неправильной фиксации лиганда является электростатическое блокирование перехода цАМФ-связывающего домена в B-конформацию. В случае домена белка дикого типа силовые линии электростатического поля, созданного атомами, несущими основной заряд в цАМФ-связывающем сайте, направлены таким образом, что, двигаясь по ним, атом водорода амидной группы A202 приближается к атому O6 цАМФ и может участвовать в образовании водородной связи с ним (рисунок 5.3 А). Если цАМФ смещен со своего положения, как может происходить в случае замены R209K, то конфигурация электростатического поля изменяется и взаимодействие амидной группы A202 с карбонильной группой G169 усиливается, а образование связи между A202 и лигандом становится маловероятным (рисунок 5.3 Б). Этот вариант развития событий также реализовывался достаточно часто.

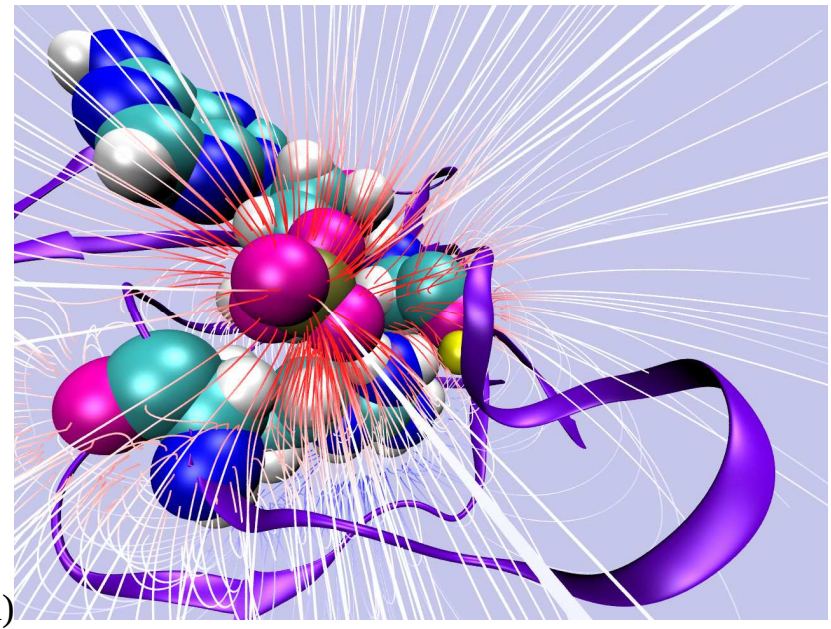
Для подтверждения гипотезы о влиянии повышенной подвижности боковой цепи K209 на стабильность B-конформации мы зафиксировали ее в области пространства, занимаемой R209. При таком положении K209 все возможные препятствия для движения и размещения боковой цепи A202, в том числе и электростатические (рисунок 5.3 В), были устранены. Результатом моделирования β-субдомена с фиксированными β2β3-петлей и боковой цепью K209 стали три стабильные конформации – B, B3 и B2 в соотношении 13%, 40%, и 47% (рисунок 5.2 З).

Таким образом, причины, по которым замена R209K влечет за собой дестабилизацию B-конформации, заключаются в повышенной подвижности боковой цепи K209 и неспособности ее фиксировать β2β3-петлю. Оба этих нарушения могут на какое-то время спонтанно исчезать, и тогда B-конформация возникает самопроизвольно. Однако вероятность этого процесса чрезвычайно мала, что находит подтверждения в экспериментальных данных [69, 70, 107].

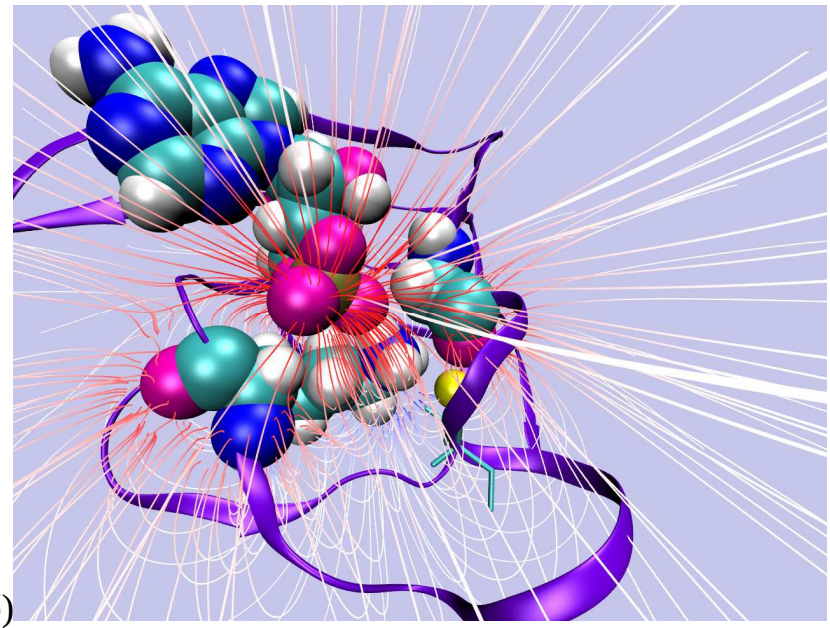


А – β-субдомен белка дикого типа в присутствии цАМФ. Б – β-субдомен белка дикого типа в отсутствие цАМФ. В – R209I в присутствии цАМФ. Г – R209E. Д – R209G. Е – R209K. Ж – R209K в присутствии цАМФ; стрелкой показан след В-конформации. З – R209K в присутствии цАМФ и с фиксированным положением боковой цепи K209. Цветовые обозначения кластеров: В – красный, Н – синий, В1 – малиновый, В2 – зеленый, В3 – желтый, Н1 – голубой. Положение β2β3-петли во всех расчетах зафиксировано

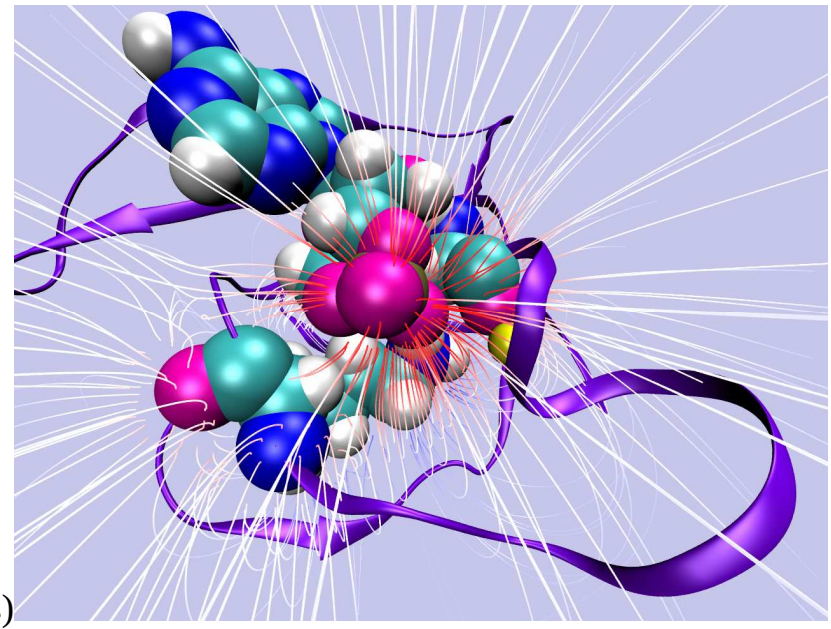
Рисунок 5.2 – Проекции кластеров конформаций β-субдомена А-домена на плоскость, образованную двумя PC



а)



б)



в)

Направление силовых линий от положительного заряда к отрицательному показано изменением цвета от синего («+») к красному («-»). Положительно заряженный атом водорода амидной группы A202, находящийся в электростатическом поле, отмечен желтой сферой. Для изображения цАМФ, G199 и остатка в 209-ом положении использованы сферы с вандерваальсовым радиусом, а остальные атомы β-субдомена представлены в виде фиолетовой ленты. а) β-субдомен белка дикого типа б) β-субдомен с точечной заменой R209K. цАМФ смещен с положения, занимаемого в домене белка дикого типа в) β-субдомен с точечной заменой R209K. K209 фиксирован в положении, близком к положению R209 в домене белка дикого типа. Картины силовых линий рассчитаны с помощью программы APBS [108]

Рисунок 5.3 – Силовые линии электростатического поля, создаваемого атомами O6 и O7 цАМФ, атомом O остатка G199 и аминокислотным остатком, находящимся в положении 209

5.3. Обсуждение результатов

5.3.1. Вопрос применимости данных, полученных на β-субдомене к целому цАМФ-связывающему домену

Как уже обсуждалось в главе 2, исследование цАМФ-связывающего домена, имеющего в своем составе α-субдомен, на предмет заселенности отдельных конформаций – очень затратный по времени и трудно реализуемый на практике процесс. Поэтому важно четко определить, насколько данные, полученные на β-субдомене, могут быть перенесены на целый цАМФ-связывающий домен. Действительно исходя из наших данных, далеко не все конформации, выявленные для β-субдомена, достижимы при наличии α-субдомена (например, B2- и B3-конформации). Однако особое значение имеет вопрос о влиянии α-субдомена на заселенность конкретно H- и B-конформаций, так как именно эти конформации играют четко обозначенные биологические роли в активации ПКА и функционировании других цАМФ-зависимых белков.

Экспериментально показано, что цАМФ-связывающие домены (данные получены методом ЯМР на цАМФ-связывающем домене белка EPAC1 [30] и A-домене ПКА Iα [31]) находятся в состоянии динамического равновесия между H- и B-конформациями, причем, судя по заселенностям этих конформаций, их свободные энергии примерно равны (G_B~G_H). В случае цАМФ-связывающего домена белка EPAC1 (а. о. 169 – 318) H-конформация несколько выгодней B-конформации (доля B-конформации >20%). У A-домена ПКА Iα (а. о. 91 – 244) искомые конформации по данным ЯМР характеризуются одинаковой устойчивостью [31], хотя в кристаллах присутствует только B-конформация [5]. А у A-домена (а. о. 119 – 244), лишенного линкерного фрагмента (а. о. 91 – 118), равновесие сдвинуто в сторону H-конформации, что связывают со стабилизирующим влиянием линкерного фрагмента на B-конформацию [31].

Исходя из наших данных, β-субдомен A-домена ПКА Iα, так же как и целый домен, находится в состоянии динамического равновесия между H- и B-конформациями, причем соотношение B- и H-конформаций равно 16:5, то есть B-конформация выгодней H-конформации

примерно на 2,9 кДж/моль. В соответствии с тем, что для А-домена (а. о. 91 – 244) показано $G_B \sim G_H$, близость свободных энергий Н- и В-конформаций β-субдомена говорит об умеренном влиянии α-субдомена на их заселенность. Тем не менее это влияние присутствует, и в случае А-домена ПКА Iα проявляется, очевидно, в том, что α-субдомен смещает равновесие в сторону Н-конформации. Впрочем, в случае других цАМФ-связывающих доменов α-субдомен, видимо, может смещать равновесие и в сторону В-конформации или не влиять на него. Так, методом малоуглового рассеяния для RC комплекса ПКА Iα показано, что В-домен в отсутствие лиганда находится преимущественно в В-конформации, и только мутации β-субдомена могут сделать Н-конформацию предпочтительной [70].

Таким образом, многочисленные экспериментальные данные дают основание полагать, что на равновесие между Н- и В-конформациями могут оказывать влияние α-субдомен и N-концевые фрагменты цАМФ-связывающего белка. Однако это влияние умеренно по величине, и в этом аспекте β-субдомен может быть взят за хорошую удобную модель цАМФ-связывающего домена.

Существует еще одно требование, которому должно удовлетворять поведение β-субдомена как модели цАМФ-связывающего домена. Мутации β-субдомена должны оказывать равное по направленности и степени воздействие как на отдельный β-субдомен, так и на соответствующий цАМФ-связывающий домен. На ряде примеров видно, что это требование выполняется. Так методом рентгеноструктурного анализа удалось установить, что внедрение мутации R333K (гомологичной мутации R209K в А-домене) в В-домен ПКА Iα приводит к преобладанию Н-конформации[23] [4]. Этот факт находится в соответствии с нашими результатами, демонстрирующими, что замена аргинина в 209 положении на лизин делает В-конформацию практически недостижимой. Изолейцин в 209-ом положении напротив очень мало влияет на функционирование ПКА Iα [34], и наши данные свидетельствуют в пользу того, что заселенность В- и Н-конформаций у этого мутанта практически такая же, как у домена белка дикого типа.

Таким образом, при рассмотрении заселенностей Н- и В-конформаций цАМФ-

[23] Этот факт на первый взгляд противоречит нашим результатам, так как нами было показано, что в отсутствие цАМФ мутация R209K мало влияет на протекание конформационного перехода. Иными словами, в составе RC комплекса В-домен с мутацией R333K тоже должен находиться в В-конформации и терять контакты с С-субъединицей. Однако более внимательное рассмотрение искомой кристаллической структуры показало наличие в цАМФ-связывающем сайте неорганического фосфата, который удерживал боковую цепь K333 в том же положении, что и цАМФ. Так как заряд K333 положительный, следует ожидать, что цАМФ-связывающий сайт В-домена практически всегда будет занят органическими или неорганическими анионами, а значит, переход его в В-конформацию будет затруднен.

связывающих доменов можно в первом приближении пользоваться данными, полученными на модели соответствующего β-субдомена. Однако надо учитывать, что доля B-конформации может быть несколько завышена или занижена.

5.3.2. Роль аминокислотного остатка в положении 209 в функционировании цАМФ-связывающего А-домена ПКА Iα

В ходе моделирования было установлено, что для β-субдомена А-домена ПКА Iα характерно состояние равновесия между несколькими конформациями. Переход между этими конформациями есть следствие внутренней подвижности белка и не зависит от присутствия каких бы то ни было лигандов. Однако заселенность различных конформаций, зависит как от наличия лиганда в цАМФ-связывающем сайте, так и от аминокислотных остатков, находящихся в некоторых критических положениях первичной последовательности белка. У β-субдоменов, несущих мутации, но близких по свойствам к белкам дикого типа, заселенность B-конформации оказывается наибольшей, а H-конформация, напротив, практически не заселена. В то же время мутации, выражающиеся в нарушении процесса активации ПКА Iα, приводят к существенному уменьшению заселенности B-конформации. Наличие агониста (цАМФ) в связывающем сайте смещает равновесие в сторону B-конформации, а действие С-субъединицы предположительно должно быть противоположно направленным и заключаться в стабилизации H-конформации.

Важный остаток, влияющий на частоты конформаций, занимает положение 209, и будет подробно обсуждаться ниже. Однако вероятно, он лишь один из многих критических остатков. Так, например, известно, что B-домен ПКА Iα в составе холофермента находится предпочтительно в B-конформации [70], а B-домен ПКА II (PDB ID: 2QVS – ПКА IIα [109], 3TNP и 3TNQ – ПКА IIβ [71]) – в H-конформации. Одно из бросающихся в глаза различий между этими доменами – разные аминокислотные остатки в положении гомологичном положению G169 А-домена ПКА Iα. У B-домена ПКА Iα в этом положении находится глицин, а у B-доменов ПКА II – аланин. Как уже обсуждалось выше (раздел 4.4) любые замены глицина в этом положении на другой остаток приводят предположительно к росту энергетического барьера перехода между H- и B-конформациями. А учитывая тот факт, что заселенности этих конформаций у B-доменов ПКА Iα и ПКА II различны, можно предположить, что замена глицина на аланин кроме того дестабилизирует B-конформацию.

Аргинин в 209-ом положении занимает особое место среди всех критических остатков, так как является частью электростатического «переключателя» R209–D170–R226, определяющего, в соответствии с литературным данными [5, 32, 65, 105], функционирование ПКА Iα (раздел 1.3.2). Модель, в которой ключевая роль в активации ПКА Iα отводится электростатическому «переключателю», базируется в том числе и на инвариантности R209 в

эволюции. Однако она совершенно не согласуется с экспериментальным фактом, согласно которому мутанты R209I и R209T практически не отличаются по своим свойствам от белков дикого типа, хотя электростатический «переключатель» у них разобщен [34]. Также эта модель не объясняет существование цАМФ-связывающих доменов (EPAC, HCN, CNG и т. д.), вовсе лишенных электростатического «переключателя». Можно предположить, что далеко не все функции остатка в 209-ом положении реализуются посредством связей с D170 и R226, и наиболее важные из этих функций требуют его участия в других взаимодействиях. Исходя из этого, мы решили условно разделить функции остатка в 209-ом положении на связанные и не связанные с электростатическим «переключателем». Последние обсуждаются в этом разделе, а первые – в разделе 5.3.3, где также изложены наши представления о роли электростатического «переключателя» в активации ПКА Iα.

Согласно нашим данным, полученным на серии мутантных β-субдоменов, остаток в 209-ом положении действительно имеет важное значение для функционирования ПКА Iα. Наши результаты позволяют утверждать, что его роль в обеспечении работы белка (без учета электростатического «переключателя») сводится к трём важным составляющим: (а) фиксации лиганда в связывающем сайте, (б) поддержанию конформации β2β3-петли (в) созданию стерически благоприятных условий для размещения A202 (а возможно, и других остатков ФСК) в положении, характерном для B-конформации, и стабилизации этого положения путем образования взаимодействия между боковыми цепями A202 и R209. Выполнение остатком в 209-ом положении всех трех названных функций способствует как появлению устойчивого энергетического минимума, отвечающего B-конформации, так и уменьшению высоты энергетического барьера перехода в него.

К сожалению, на основании полученных нами данных можно строго говорить только о роли остатка в 209-ом положении в стабилизации/дестабилизации конформаций, принимаемых A-доменом. Однако наблюдения за поведением систем в ходе моделирования позволяют коснуться и влияния 209-ого остатка непосредственно на процесс конформационного перехода. Разумеется, все высказанные по этому поводу соображения приводятся только в рамках обсуждения с целью постановки задач для будущих исследований. Никакие строгие научные выводы из этих наблюдений следовать не могут.

В соответствии с литературными и нашими данными цАМФ стабилизирует B-конформацию в большей степени, чем H, то есть смещает равновесие в сторону B-конформации [31]. Кроме того, цАМФ вызывает увеличение константы скорости диссоциации R- и C-субъединиц примерно на два порядка [42, 65], а следовательно, уменьшает высоту энергетического барьера конформационного (H → B) перехода A-домена. В то же время, как нам удалось пронаблюдать на примере мутанта R209K (раздел 5.2.6), даже незначительное

смещение цАМФ со своего положения в связывающем сайте может полностью блокировать конформационный переход А-домена. Это происходит вследствие создания неблагоприятного для движения амидной группы A202 электростатического поля. Таким образом, правильная и крепкая фиксация лиганда в цАМФ-связывающем сайте – важный фактор для функционирования ПКА. Очевидно, что среди всех рассмотренных нами аминокислотных остатков только аргинин и лизин при связывании лиганда формируют электростатическое, а значит отличающееся большой энергией, взаимодействие. При этом боковая цепь аргинина образует водородные связи с карбонильной группой N171 (рисунок 5.1 А) и таким образом фиксирует не только свое положение в цАМФ-связывающем сайте, но и положение лиганда. Боковая цепь лизина короче боковой цепи аргинина и потому не образует постоянных водородных связей ни с одним из аминокислотных остатков, а наоборот, очень подвижна. Результатом этой подвижности является либо неправильное положение лиганда в связывающем сайте (о последствиях которого говорилось выше), либо разрушение взаимодействий между сайтом и лигандом (водородные связи с G199 и A210) и быстрый уход последнего с поверхности белка. Стоит отметить, что изолейцин образует с лигандом только относительно слабое вандерваальсово взаимодействие и потому уступает по энергии связывания аргинину и лизину. Однако он не дестабилизирует другие связи, удерживающие лиганд, и не вызывает изменения его положения в пределах цАМФ-связывающего сайта. В результате изолейцин не уступает лизину в фиксации лиганда, а даже превосходит его.

β2β3-петля конформационно подвижный элемент вторичной структуры цАМФ-связывающего домена. В отсутствие стабилизирующих факторов она существует в виде ряда конформаций, однако только в одной из них одновременно реализуется гидрофобный карман для «упаковывания» боковой цепи L203 и создаются благоприятные условия для того, чтобы A202 мог преодолеть барьер над G169 и занять положение, свойственное B-конформации. Согласно литературным данным, аргинин в 209-ом положении поддерживает правильный изгиб β2β3-петли, а она, в свою очередь, фиксирует положение боковой цепи аргинина. Взаимоподдерживающее расположение этих двух элементов цАМФ-связывающего сайта, необходимое для стабилизации B-конформации и понижении барьера конформационного перехода, становится возможным благодаря CH-π взаимодействию между гуанидиновой группой аргинина и Hα атомом G169, входящего в состав β2β3-петли [52]. Другие исследуемые нами остатки лишены π-электронной плотности и не могут образовывать такого взаимодействия. Однако изолейцин и глутаминовая кислота частично компенсируют его отсутствие слабыми электростатическими и вандерваальсовыми взаимодействиями между своими боковыми цепями и G169. Таким образом, только эти две системы из всех рассматриваемых могут в некоторой степени поддерживать нужную конформацию β2β3-петли

и моделироваться без ее дополнительной фиксации. Лизин и, очевидно, глицин в 209-ом положении не способны стабилизировать необходимый изгиб β2β3-петли и способствуют проявлению ее естественной конформационной подвижности. В результате возрастает барьер между H- и B-конформациями и уменьшается энергия последней. Как и следует ожидать, B-конформация в этих случаях реализуется достаточно редко и быстро разрушается.

Неожиданным для нас стало то, что остаток в 209-ом положении не только опосредованно через другие структуры, но и напрямую может влиять на предпочтение домена к B-конформации и скорость перехода в нее. Как и β2β3-петля, он создает благоприятные или неблагоприятные (если речь идет о мутационных заменах R209, нарушающих активацию ПКА Iα) условия для того, чтобы A202 мог преодолеть энергетический барьер и занять положение, свойственное B-конформации. Стабилизация этого положения путем формирования взаимодействия между боковыми цепями 202-ого и 209-ого остатков также входит в функции последнего. Среди всех исследованных нами аминокислотных остатков только аргинин и изолейцин способствуют таким образом явному преобладанию B-конформации, причем изолейцин, по всей видимости, стабилизирует ее даже лучше, чем аргинин. цАМФ-связывающие домены с глицином, глутаминовой кислотой или лизином в 209-ом положении, напротив, не характеризуются большой долей B-конформации. У мутантов R209G и R209E боковые цепи 202-ого и 209-ого остатков не образуют взаимодействия, стабилизирующего B-конформацию, из-за малого размера глицина (R209G) или удаленности глутаминовой кислоты от положения, занимаемого в норме аргинином (R209E). В случае мутанта K209R ситуация обратная: боковая цепь лизина (в присутствии цАМФ) или CH2-группа в ее β-положении (в отсутствии цАМФ) стерически препятствуют свойственному B-конформации размещению боковой цепи A202. Также, в присутствии цАМФ, боковая цепь лизина вследствие своей большой подвижности стерически дестабилизирует переходное состояние между H- и B-конформациями, что приводит к уменьшению частоты конформационного (H → B) перехода.

Таким образом, по крайней мере ряд важных функций остатка в 209-ом положении не реализуются посредством электростатического «переключателя», и некоторые аминокислотные остатки, не способные к формированию электростатических взаимодействий с D170 и R226, могут без существенных изменений в конформационной динамике A-домена ПКА Iα замещать собой остаток аргинина. Тем не менее в большей или меньшей степени, но все рассмотренные нами мутационные замены R209 уменьшают устойчивость B-конформации и предположительно повышают энергетический барьер перехода в нее. Сила их дестабилизирующего влияния на B-конформацию и конформационный переход в присутствии цАМФ увеличивается в ряду I<K<E(G), а в отсутствие цАМФ – в ряду I<E<G<K. Совпадение установленных нами рядов с рядами, полученными экспериментально и характеризующими меру влияния мутаций на

активацию ПКА Iα [34], позволяет утверждать, что чем больше в присутствии мутации заселена B-конформация, тем меньшее влияние оказывает эта мутация на активацию ПКА. Видимо, склонность к формированию B-конформации, является определяющей чертой для корректного функционирования цАМФ-связывающих доменов. И остаток в 209-ом положении играет не последнюю роль в повышении ее устойчивости и скорости образования. В этой связи стабильность в эволюции искомого аргинина определяется его способностью наилучшим образом совмещать все названные составляющие стабилизации B-конформациии и уменьшения барьера конформационного перехода в нее. Другие аминокислотные остатки могут замещать аргинин, но при этом будут наблюдаться нарушения активации ПКА, от еле заметных (в случае изолейцина), до существенных (в случае лизина, глицина или глутаминовой кислоты).

5.3.3. Электростатический «переключатель» R209–D170–R226 как механизм стабилизации конечных конформаций А-домена ПКА Iα, а не реализации конформационного перехода между ними

Тот факт, что аргинин в 209-ом положении важен, но не обязателен для конформационного перехода А-домена ПКА Iα и стабилизации B-конформации, заставляет нас переосмыслить роль, отведенную в литературе электростатическому «переключателю» R209–D170–R226. В соответствии с нашими наблюдениями электростатический «переключатель» не участвует непосредственно в конформационном переходе домена (в отличие от гидрофобного «переключателя»), а выполняет функцию дополнительной стабилизации B-конформации с помощью водородной связи R209–D170 (рисунок 5.1 А, Г) и H-конформации с помощью аналогичной связи R226–D170. Принимая эту гипотезу, можно объяснить все имеющиеся экспериментальные данные по функционированию доменов с мутационными заменами остатков D170, R209 и R226.

Мутационные замены R209 рассмотрены нами в предыдущем разделе главы 5. Мы не будем их касаться в этом разделе, а остановимся только на мутационных заменах остатков D170 и R226.

Центральным звеном электростатического «переключателя» является, несомненно, D170. Мутанты D170A связывают цАМФ почти с той же аффинностью, что и домены белка дикого типа, и не имеют нарушений конформационного перехода [32, 35 ,58]. Однако внедрение этой мутации приводит к повышению аффинности комплекса регуляторной субъединицы и цАМФ (RcAMP) к каталитической субъединице более чем в 10 раз [35]. Другими словами, мутантный комплекс регуляторной субъединицы и цАМФ ведет себя так, как если бы цАМФ был удален денатурацией («лишенный цАМФ» фенотип). Единственное объяснение этой совокупности фактов состоит в том, что замена глутаминовой кислоты на

аланин в положении 170 приводит к уменьшению энергетического барьера для B→H (а вероятно и H→B) перехода. В данном случае уменьшение энергетического барьера вряд ли связано с повышением устойчивости переходного состояния, иначе из всех приведенных экспериментальных данных должен следовать вывод, что электростатический «переключатель» усложняет активацию ПКА Iα. Скорее причина заложена в дестабилизации B-конформации при разобщении связи R209–D170, а энергия переходного состояния остается неизменной. В пользу такого объяснения говорят и данные ЯМР анализа, согласно которым равновесие у D170A мутантов в отсутствие лиганда по сравнению с белками дикого типа сдвинуто в сторону H-конформации [58]. Тем не менее заселенность B-конформации сохраняется у таких доменов достаточно высокой, и мутация D170A не делает ее полностью недостижимой. Экспериментальное подтверждение этому получено с помощью измерения гашения флуоресценции W260 в ответ на связывание цАМФ с сайтом A-домена [35].

Остаток R226 расположен на N-конце B/C-спирали, и его боковая цепь в H-конформации образует электростатическое взаимодействие с боковой цепью D170. Мутации R226, разобщающие это взаимодействие, фенотипически проявляются в том, что облегчают активацию ПКА Iα (константа активации уменьшается в 20 раз) [32]. Как и в случае мутаций D170, этот факт можно исчерпывающе объяснить уменьшением устойчивости одной из конформаций A-домена при разобщении связи R226–D170. Только в этот раз речь идет, очевидно, об H-конформации. Иными словами, высота энергетического барьера H→B конформационного перехода у R226A мутанта уменьшается, а энергия переходного состояния остается неизменной.

Интересно, что остаток K242, видимо, играет ту же роль, что и D170, стабилизируя B-конформацию и увеличивая таким образом высоту энергетического барьера между B- и H-конформациями. Фенотип мутанта K242A такой же, как и у мутанта D170A [35], и, исходя из структуры белка, маловероятно, что K242 участвует в конформационном переходе A-домена. Мы обратили внимание, что боковая цепь K242 в B-конформации может формировать водородную связь с OH-группой боковой цепи Y205. Очевидно, что эта водородная связь, если существует, то выполняет ту же функцию, что и связь R209–D170, то есть повышает устойчивость B-конформации. Это приводит к двум последствиям: увеличивается доля B-конформации и константа скорости конформационного перехода из B- в H-конформацию уменьшается. В результате, не воздействуя на механизм конформационного перехода, оба остатка D170 и K242 делают B-конформацию более стабильной и предотвращают реализацию «лишенного цАМФ» фенотипа. Последний факт очень важен для правильного функционирования ПКА в физиологических условиях.

Таким образом, анализ имеющихся экспериментальных данных в совокупности с нашими результатами, изложенными в разделе 5.3.2, позволяет говорить о том, что электростатический «переключатель» R209–D170–R226, важен для стабилизации H- и B-конформаций, но не играет роли в процессе конформационного перехода A-домена, хотя непосредственно остаток R209 участвует в обоих процессах. Исследование стабилизации B-конформации с помощью R209–D170 и K242–Y205 связей и H-конформации с помощью R226–D170 связи было за пределами нашего исследования. Однако мы надеемся, что соответствие нашей гипотезы широкому спектру экспериментальных фактов станет основанием для переосмысления и дальнейшего исследования роли электростатического «переключателя» R209–D170–R226.

В заключение этой главы следует вернуться к обсуждению, начатому в разделе 4.3.2. В нем упоминается, что многие исследователи видят причину обратного агонизма Rp-цАМФS в блокировании конформационного перехода путем разобщения электростатического «переключателя» R209–D170–R226 [58, 65]. В данном разделе мы попытались показать, что электростатический «переключатель» важен для стабилизации конечных конформаций домена, однако не играет роли в конформационном переходе. Таким образом, даже если Rp-цАМФS разобщает электростатический «переключатель», это не может оказывать существенного влияния на конформационный переход. По нашим предположениям единственный возможный механизм действия Rp-цАМФS заключается в блокировании гидрофобного «переключателя», который и играет ключевую роль в конформационном переходе. То, каким образом эта роль осуществляется, будет рассмотрено в шестой главе настоящей диссертации.

5.4. Промежуточные выводы

1) β-субдомен является удобной моделью для изучения конформационной динамики соответствующего цАМФ-связывающего домена. Однако доля B-конформации при использовании этой модели может быть несколько завышена или занижена.

2) β-субдомен A-домена ПКА Iα находится в состоянии динамического равновесия между несколькими конформациями, две из которых (H и B) характерны для любого цАМФ-связывающего домена, независимо от мутаций в β-субдомене и присутствия α-субдомена.

3) Для β-субдомена A-домена ПКА Iα B-конформация несколько выгодней, чем H-конформация, что отличает его от целого A-домена и свидетельствует в пользу участия α-субдомена в смещении равновесия в сторону H- конформации.

4) Заселенность B-конформации β-субдомена A-домена ПКА Iα увеличивается в присутствии цАМФ и зависит от ряда аминокислотных остатков, находящихся в некоторых критических положениях первичной последовательности белка. Особое место среди таких остатков занимает R209.

5) R209 выполняет свои функции в активации ПКА Iα как посредством участия в электростатическом «переключателе» R209–D170–R226, так и не связано с ним.

6) Не связанные с электростатическим «переключателем» функции R209 заключаются в: (а) фиксации лиганда в связывающем сайте, (б) поддержании конформации β2β3-петли (в) создании стерически благоприятных условий для размещения A202 в положении, характерном для B-конформации, и стабилизации этого положения путем образования взаимодействия между боковыми цепями A202 и R209. Выполнение аргинином в 209-ом положении всех трех названных функций способствует появлению устойчивого энергетического минимума, отвечающего B-конформации, и, вероятно, уменьшению высоты энергетического барьера перехода в него.

7) Роль R209 в электростатическом «переключателе» заключается в дополнительной стабилизации B-конформации с помощью водородной связи R209–D170. Также, электростатический «переключатель» стабилизирует H-конформацию с помощью аналогичной связи R226–D170. Вопреки распространенному убеждению электростатический «переключатель» не играет роли в процессе конформационного перехода A-домена.

8) Все рассмотренные нами мутационные замены R209 препятствуют выполнению той или иной функции остатка в 209-ом положении и уменьшают таким образом устойчивость B-конформации (и предположительно повышают энергетический барьер перехода в нее). Сила их дестабилизирующего влияния на B-конформацию в присутствии цАМФ увеличивается в ряду I<K<E(G), а в отсутствие цАМФ – в ряду I<E<G<K. Сопоставление этих рядов с экспериментальными данными по активации ПКА Iα дает основание полагать, что склонность к формированию B-конформации лежит в основе корректного функционирования, как отдельных цАМФ-связывающих доменов, так и целого белка.

9) Инвариантность в эволюции аргинина в 209-ом положении определяется его способностью наилучшим образом совмещать выполнение всех перечисленных функций, причем функция, связанная с участием в электростатическом «переключателе», имеет среди них наименьшее значение.

6. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕХАНИЗМА ПЕРЕХОДА А-ДОМЕНА R-СУБЪЕДИНИЦЫ ПКА Iα ИЗ Н- В В-КОНФОРМАЦИЮ. РОЛЬ ГИДРОФОБНОГО И ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО «ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЕЙ» В ИЗМЕНЕНИИ КОНФОРМАЦИИ цАМФ-СВЯЗЫВАЮЩИХ ДОМЕНОВ

В предыдущих главах детально рассмотрено первое событие перехода А-домена ПКА Iα из Н- в В-конформацию, включающее в себя образовании водородной связи между амидной группой A202 и лигандом и «упаковывание» боковой цепи L203 в гидрофобный карман, образованный β2β3-петлей. Там же показано, что электростатический «переключатель» R209–D170–R226 только стабилизирует конечные Н- и В-конформации А-домена, но не принимает участие в переходе между ними. Тем не менее в предыдущих главах не дан ответ на вопрос о конкретном механизме, передающем информацию о связывании лиганда на отдаленные от него структуры белка. На наш взгляд, эту роль должен играть гидрофобный «переключатель» L203–Y229, подробно описанный в разделе 1.3.2. Впервые такая точка зрения была высказана и экспериментально подтверждена группой исследователей под руководством Хольгера Рехманна [30, 33]. Однако дальнейших исследований в этом направлении не предпринималось, так как интерес других групп ученых был обращен в основном к электростатическому «переключателю». Мы решили исправить это упущение и провести моделирование работы гидрофобного «переключателя» с целью уточнения основных принципов его функционирования. Также мы предприняли попытку изучить запускаемые гидрофобным «переключателем» события, поскольку сведения о них в литературе отсутствуют.

Для проведения расчетов были выбраны А-домены дикого типа и с мутационной заменой R209K, приводящей к разобщению электростатического «переключателя». Обе системы моделировались при фиксированном положении β2β3-петли. Кроме того, в соответствии с полученными ранее данными (раздел 5.2.6), для успешного моделирования А-домена с заменой R209K была зафиксирована и боковая цепь K209.

Итогом предпринятых исследований стало описание механизма перехода А-домена из Н- в В-конформацию как частично детерминированной последовательности элементарных конформационных изменений. А сравнение механизмов переходов двух выбранных систем позволило сделать выводы о функциях электростатического «переключателя» и остатка в положении 209 на уровне целого домена.

Изложению и обсуждению полученных в этой серии опытов результатов посвящена шестая глава настоящей диссертации.

6.1. Оценка результатов моделирования H→B конформационного перехода для A-доменов дикого типа и с мутационной заменой R209K

Моделирование конформационного H→B перехода проводилось двенадцать раз для A-домена дикого типа и один раз для A-домена с мутационной заменой R209K в соответствии с методикой, изложенной в разделе 2.4.2. В результате было получено тринадцать равновесных систем, белковые молекулы в которых визуально схожи между собой и несут черты B-конформации, а также существенно отличаются от исходной структуры, в которой A-домен в H-конформации связан с цАМФ. Для более точной характеристики состояния доменов, достигнутого в результате моделирования, мы выбрали четыре параметра. Эти параметры представляют собой среднеквадратичное расстояние между атомами A-домена, уравновешенного после совершившегося перехода, и соответствующими атомами того же домена, закристаллизованного в B-конформации [27]. Первый параметр, $RMSD_B$(ФСК), отражает состояние ФСК; второй, $RMSD_B$(N3A), характеризует положение N3A-мотива; третий, $RMSD_B$(B/C-h), дает сведения о конформации B/C-спирали; четвертый, $RMSD_B$(A), служит мерой различия белковых остовов в целом. Значения параметров были рассчитаны согласно методике, изложенной в разделе 2.5.1, и приведены в таблице 6.1[24].

Таблица 6.1 – Среднеквадратичное расстояние между атомами A-домена R-субъединицы ПКА Iα в одной из рассматриваемых конформаций и соответствующими атомами того же домена, закристаллизованного в B-конформации

	$RMSD_B$(ФСК),Å	$RMSD_B$(N3A),Å	$RMSD_B$(B/C-h), Å	$RMSD_B$(A), Å
A-домен, находящийся в составе RC комплекса в H-конформации (данные рентгеноструктурного анализа) [29]				
A-домен дикого типа	3,25	7,35	15,01	6,82
A-домен в конформации, достигнутой в результате моделирования H→B конформационного перехода (расчетные данные)				
A-домен дикого типа	0,63±0,01[25]	1,93±0,11	1,68±0,11	1,20±0,05
A-домен с заменой R209K	0,62	1,56	1,27	0,98

В первой значащей строке таблицы даны значения RMSD, полученные с использованием

[24] Автор благодарен Вершининой Е. А.за помощь в статистической обработке данных, приведенных в таблице 6.1.

[25] Указана стандартная ошибка среднего, рассчитанная по двенадцати опытам.

только данных рентгеноструктурного анализа [27, 29]. Они показывают различия между H- и B-конформациями A-домена и являются исходными для нашего исследования. В процессе моделирования A-домен должен покинуть H-конформацию, характеризующуюся указанными значениями, и прийти в минимум, отвечающий B-конформации, в котором значения всех четырех параметров близки нулю. Вторая и третья значащие строки таблицы содержат информацию о том, в какой мере этот процесс состоялся для A-домена дикого типа и с мутационной заменой R209K. В обеих системах самые близкие к нулю значения были получены для изменения ФСК, а самые далекие от нуля – для N3A-мотива. Но в целом и те и другие позволяют утверждать, что в результате предпринятого моделирования для обеих систем была достигнута B-конформация. А следовательно, разработанная нами методика (раздел 2.4.2) пригодна для изучения H→B конформационного перехода A-домена ПКА Iα.

Отдельно стоит отметить достоверно меньшие значения всех параметров, кроме $RMSD_B$(ФСК), для системы с мутационной заменой R209K, чем для домена дикого типа. Возможно, что столь неожиданный результат закономерен, и причины его заключаются в выполненной нами фиксации выгодного положения боковой цепи 209-ого остатка. Однако мы не беремся делать такие выводы и рассматриваем более близкое к B-конформации состояние A-домена с заменой R209K как ошибку, связанную с отсутствием выборки.

6.2. Общая характеристика стадий и событий перехода A-домена из H- в B-конформацию

Анализ переходов A-домена из H- в B-конформацию проводился с использованием факторного и кросскорреляционного анализов согласно приведенной в разделе 2.4.3 методике. Итогом применения этих методов стало выявление для каждого из переходов факторов и расположение этих факторов в порядке следования во времени соответствующих им стадий. Полученные таким образом описания всех тринадцати моделирований приведены в приложении B.

Исходя из основ факторного анализа, каждый фактор указывает на все изменения, происходящие в белке одновременно. При этом, судя по нашим результатам, среди них есть такие, которые практически во всех опытах следуют вместе. Их совокупность мы назвали событием. Событием, например, оказался переход спирали ФСК из H- в B-конформацию, включая «упаковывание» боковой цепи L203 в гидрофобный карман. Однако одна стадия может охватывать и такие изменения конформации, которые не всегда коррелируют друг с другом. Их одновременную в ряде опытов реализацию следует интерпретировать как присутствие нескольких событий в пределах одной стадии. Всего в переходе A-домена из H- в B-конформацию было выделено семь событий. В этом разделе мы будем использовать буквенные

обозначения этих событий, введенные в приложении В (и в пояснениях к рисунку 6.1), а в последующих разделах расшифруем, какие конкретные конформационные изменения стоят за каждым из них.

Для понимания механизма конформационного перехода А-домена основополагающим является ответ на вопрос: следуют ли выделенные события друг за другом в определенном порядке или же наступают хаотично. Как свидетельствуют наши данные, некоторый порядок существует, однако он не является строго детерминированным и носит в ряде аспектов вероятностный характер.

Основываясь на видимых закономерностях в очередности наступления событий, мы смогли выделить стадии, присущие всем рассмотренным переходам. Эти стадии характеризуются хотя бы одним общим для всех опытов событием и определенным порядком следования. Помимо них были обнаружены другие стадии, свойственные лишь части опытов и отличающиеся не столь постоянным составом событий. Сгруппировав все схожие стадии для всех опытов и не нарушив при этом установленный порядок их наступления, мы составили удобную для анализа схему показанных нами путей конформационного перехода А-домена (рисунок 6.1). Изучение этой схемы позволило дать общую характеристику исследуемого процесса с учетом его одновременной детерминированности и стохастичности.

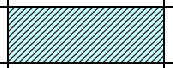
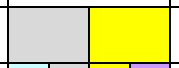
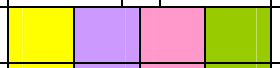
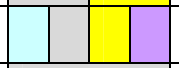
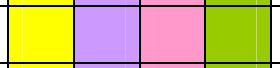
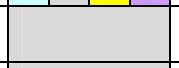
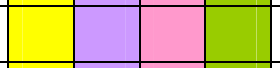
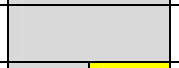
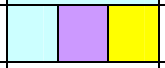
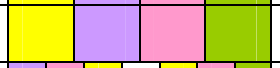
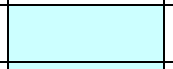
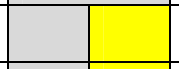
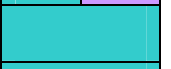
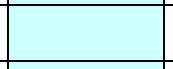
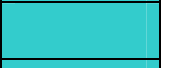
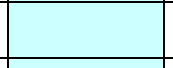
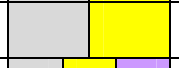
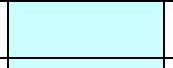
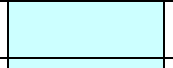
Как следует из приведенных данных (рисунок 6.1), существует несколько черт конформационного перехода А-домена, свидетельствующих о его стохастичности. Во-первых, события А и Е хотя и занимают с высокой вероятностью определенное место в детерминированной последовательности событий, но эта вероятность не равна единице. Во-вторых, события В и Г характеризуются варьирующей между путями перехода протяженностью и неравномерностью протекания. И наконец в-третьих, даже те события, которые подчиняются детерминированному порядку, могут наступать не только после предыдущего события, но и одновременно с ним (то есть не ранее предыдущего). В результате в некоторых опытах два и более события могут происходить на одной стадии, а в других – своя стадия соответствует каждому событию.

Все перечисленные нами неопределенности конформационного перехода А-домена хорошо укладываются в современное представление о механизме изменения конформации белка как об ансамбле путей перехода (transition path ensemble) [110, 111]. В зависимости от типа ландшафта потенциальной энергии возможно два предельных состояния этого ансамбля в фазовом пространстве – локализованное и делокализованное. В первом случае речь идет о гладком энергетическом ландшафте с небольшим количеством барьеров, существенно превышающих по высоте амплитуду температурного шума (k_BT). Все пути перехода на таком ландшафте локализованы в узкой области фазового пространства, а сам переход может

описываться такими классическими понятиями как переходные состояния и путь минимальной энергии (minimum energy path, MEP, ПМЭ)[26]. Во втором случае энергетический ландшафт шероховатый, с множеством барьеров, большинство из которых близки по высоте к амплитуде температурного шума. В таких системах под влиянием энтропийного фактора ансамбль путей перехода делокализуется в фазовом пространстве, делая понятия переходного состояния и ПМЭ непригодными для описания реальной картины процесса. Локализовать ансамбль путей перехода становится возможным, перейдя от фазового пространства к пространству меньшей размерности, образованному коллективными переменными, и от ландшафта потенциальной энергии к ландшафту свободной энергии. Считается, что при правильном выборе коллективных переменных ландшафт свободной энергии будет гладким даже в том случае, если ландшафт потенциальной энергии был шероховатым. В новом пространстве применительно к пучку путей перехода вводятся уже новые характеристики: вместо переходного состояния – ансамбль переходных состояний (transition state ensemble), вместо пути минимальной энергии – путь минимальной свободной энергии (minimum free energy path, MFEP, ПМСЭ). Наряду с ПМСЭ используют и более точные оценки пути перехода: путь максимального потока траекторий (maximum flux transition path, MFTP), который, впрочем, сводится к ПМСЭ при T→0 K, и путь, проходящий в центре потока траекторий [111, 112]. Однако расчет последних двух путей сложнее расчета ПМСЭ и пока не имплементирован ни в один из программных пакетов.

Таким образом, в рамках настоящей диссертации мы рассмотрели некоторую выборку из ансамбля путей перехода, на основании которой получили начальное приближение к ПМСЭ (ПМЭ) (подробнее раздел 6.4). Вследствие того, что моделирование перехода проводилось неоднократно и без приложения внешних сил, полученных приближений должно быть достаточно для понимания структурной стороны конформационных изменений A-домена. Но для описания их энергетической стороны, очевидно, необходимо уточнение ПМСЭ (ПСЭ) и расчет вдоль него профиля свободной энергии. Учитывая важность хорошего начального приближения для таких исследований и имея в планах на будущее их проведение, мы рассматриваем изложенные в этой главе результаты не только как самостоятельный структурный анализ, но и как необходимый подготовительный этап к дальнейшим энергетическим расчетам.

[26] Путь минимальной энергии (он же наиболее вероятный путь перехода) можно определить так. Пусть есть путь γ в фазовом пространстве, z – произвольная точка на нем, а Pz – гиперплоскость, которая проходит через z перпендикулярно γ. Тогда γ является путем минимальной энергии, если для любой точки z, принадлежащей γ, z – локальный минимум потенциальной энергии V на Pz [110].

Опыты	Стадия 1	Стадия 2	Стадия 3	Стадия 4	Стадии 5–6		Стадия 7	Стадия 8
					5	6		
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
R209K								
9								
10								
11								
12								

Сводная таблица построена на основе данных, приведенных в приложении В. Все стадии даны в том порядке, который установлен кросскорреляционным анализом. Условные обозначения (цвета, штриховка) те же, что в приложении В. Голубым цветом отмечено событие А, состоящее в восстановлении водородных связей спирали ФСК после устранения деформирующего влияния С-субъединицы. Серым цветом выделен переход ФСК из Н- в В-конформацию, включая «упаковывание» боковой цепи L203 в гидрофобный карман (процессы, подробно описанные в главах 4 и 5) (событие Б). Сиреневым цветом показано движение N3A-мотива в сторону от ФСК (событие В), а желтым цветом – поворот B/C-спирали (событие Г). Образование вандерваальсова взаимодействия между Y229 и β-субдоменом отмечено розовым цветом (событие Д). Зеленым цветом показан переход фрагмента B/C-спирали из α- в π-форму и сопутствующее ему увеличение энергии взаимодействия B/C-спирали с ФСК и N3A-мотивом (событие Е). Событие, заключающееся в образовании излома B/C-спирали на месте фрагмента π-спирали, а также в фиксации этого излома электростатическим взаимодействием R241–E200 и в меньшей степени вандерваальсовым взаимодействием L238–I204, обозначено темно-бирюзовым цветом (событие И). Диагональной штриховкой слева направо снизу вверх отмечены события, совершающиеся в направлении характерном для перехода из В- в Н-конформацию. Кроме того, диагональной штриховкой слева направо сверху вниз отмечено событие восстановления спирали ФСК после устранения С-субъединицы в опыте 1. Факторный анализ не выявил это событие, так как оно состоялось сразу после начала моделирования. Однако мы определили его визуально и поместили в суммарную таблицу для создания более целостной картины

Рисунок 6.1 – Схема показанных нами путей перехода А-домена ПКА Iα из Н- в В-конформацию

6.3. Описание событий конформационного перехода А-домена из Н- в В-конформацию

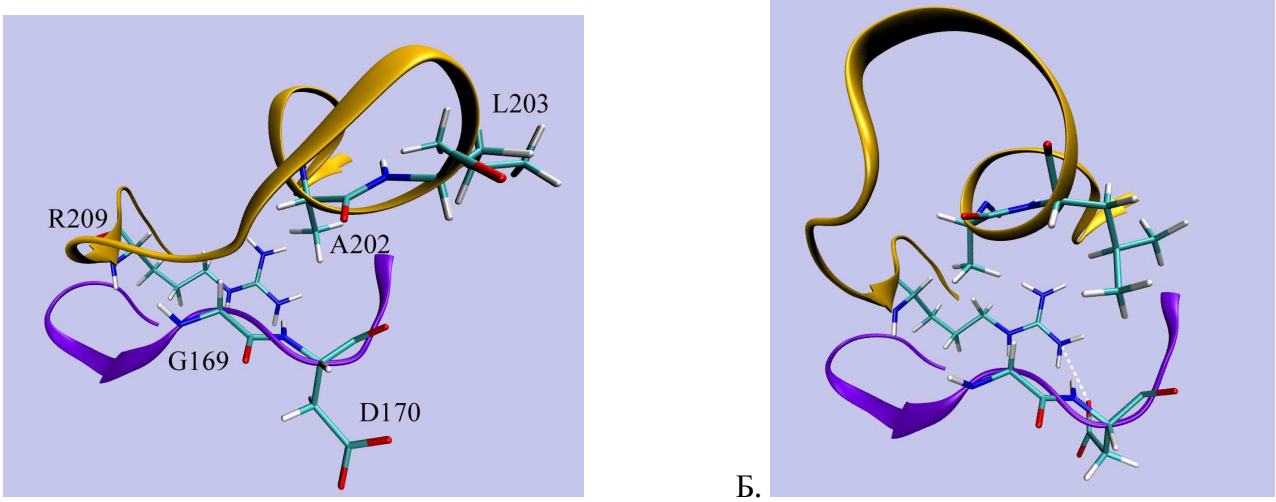
6.3.1. События, в основе которых лежит конформационное изменение ФСК

События А и Б, отмеченные на рисунке 6.1 голубым и серым цветом соответственно, представляют собой конформационные изменения ФСК.

Событие А определяется главным образом формированием водородной связи I201(C=O)–Y205(N-H), характерной для α-спирали ФСК. Важно отметить, что это событие не имеет отношения к рассмотренному выше переходу B`-спирали ФСК из 3_{10}- в α-форму (разделы 4.1, 5.1), так как названная связь по результатам нашего моделирования присутствует не только в В-, но и в Н-конформации β-субдомена А-домена. По этой же причине событие А сложно отнести непосредственно к переходу А-домена из Н- в В-конформацию. Однако учитывая непостоянное положение события А в череде других событий, можно предположить, что оно определяет восстановление структуры ФСК после устранения деформирующего влияния С-субъединицы. Действительно из данных рентгеноструктурного анализа известно, что боковая цепь Y205 в RC комплексе образует водородную связь с боковой цепью остатка С-субъединицы Y247 [4, 28]. Смещение боковой цепи Y205 в сторону С-субъединицы и приводит к разрыву ряда водородных связей, определяющих структуру ФСК. В первую очередь к ним относится названная выше водородная связь I201(C=O)–Y205(N-H), а в меньшей степени и

соседняя связь E200(C=O)–I204(N-H). Вклад последней связи в событие А менее существенный и не столь постоянный, потому что процесс ее восстановления сопряжен также с переходом B`-спирали ФСК из 3_{10}- в α-форму.

В отличие от события А, событие Б (рисунок 6.2) не только имеет непосредственное отношение к переходу А-домена в В-конформацию, но и является пусковым механизмом, приводящим в действие череду остальных событий. О его совершении можно судить по коррелированному изменению значений девяти параметров. Во-первых, образуются две водородные связи между цАМФ и белком: A202(N-H)–цАМФ(O6) (подробнее глава 4) и A201(N-H)–цАМФ(O3`). Обе они оказывают сонаправленное положительное воздействие на стабилизацию В-конформации. Во-вторых B`-спираль ФСК преобразуется из 3_{10}- в α-форму, о чем свидетельствуют разрушение связи G199(C=O)–A202(N-H) и формирование связи E200(C=O)–I204(N-H). Одновременно образуется связь A202(C=O)–T207(N-H), которая стабилизирует B`-спираль в ее α-форме. В-третьих, происходит разрыв водородных связей G169(N)–T207(O) и G169(N)–G206(O), поддерживающих в Н-конформации минимальное расстояние между β2β3-петлей и ФСК. В-четвертых, боковая цепь L203 укладывается в гидрофобный карман, что сопровождается увеличением энергии взаимодействия между ней и β2β3-петлей. И наконец, в-пятых, $RMSD_B$(ФСК) уменьшается с 3 Å до 0,6 Å, подтверждая факт перехода ФСК в В-конформацию. Кратко событие Б можно охарактеризовать как образование связи между цАМФ и амидной группой A202, сопровождаемое переходом B`-спирали ФСК в α-форму и упаковыванием боковой цепи L203 в гидрофобный карман. Детальному описанию этого события посвящены четвертая и пятая главы настоящей диссертации.



А – Н-конформация; Б – В-конформация. Лентами разных цветов показаны надвторичные структуры А-домена: оранжевой – ФСК, фиолетовой – β2β3-петля. Отмечены аминокислотные остатки, принимающие участие в конформационном переходе (R209, G169, A202, L203) и стабилизирующие В-конформацию (D170). Лиганд в связывающем сайте не показан

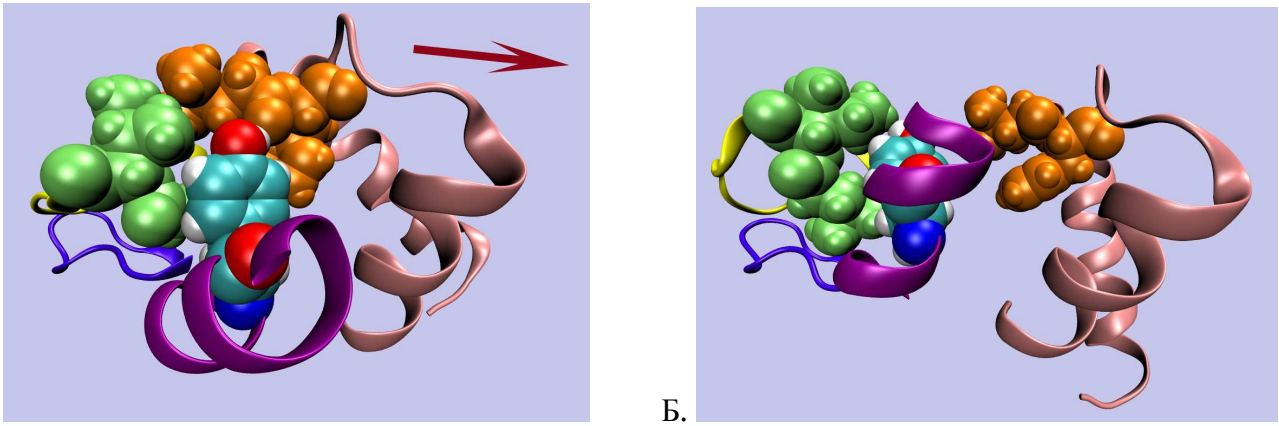
Рисунок 6.2 – Событие Б. Переход ФСК в В-конформацию

6.3.2. События, в основе которых лежит конформационное изменение N3A-мотива

Событие B, выделенное на рисунке 6.1 сиреневым цветом, заключается в смещении N3A-мотива по направлению от ФСК, как показано на рисунке 6.3.

На основании рассмотренных переходов можно предположить, что событие B запускается изменением конформации B`-спирали, а в особенности изменением положения ее остатков L203 и I204, то есть событием Б. В H-конформации боковые цепи L203 и I204 со стороны ФСК, а также L135 и F136 со стороны N3A-мотива образуют гидрофобный кластер, при этом расстояние между Cα атомами L135 и I204 равно приблизительно 8Å (рисунок 6.3 А). В результате перехода B`-спирали в α-форму, боковые цепи L203 и I204 удаляются от того положения, в котором энергия взаимодействия, стабилизирующего гидрофобный кластер, максимальна. Вероятность разрыва кластера повышается, и, как только N3A-мотив теряет связь с ФСК, он начинает сдвигаться в сторону от нее. В B-конформации взаимодействие между ФСК и N3A-мотивом отсутствует, а расстояние между названными выше Cα атомами увеличивается до 15Å (рисунок 6.3 Б).

Также смещение N3A-мотива приводит к ослаблению его взаимодействия с B/C-спиралью, о чем можно судить по разрушению контактов между остатком B/C-спирали Y229 и остатками N3A-мотива L135 и F136. Однако на более поздних стадиях перехода между N3A-мотивом и B/C-спиралью образуются стабилизирующие B-конформацию гидрофобные взаимодействия. Одно из них (взаимодействие между L135, F136 и L139 со стороны N3A-мотива и L233 со стороны B/C-спирали) лежит в основе события E и является причиной появления излома между B- и C-спиралями.



А. Б.

А – H-конформация; Б – B-конформация. Лентами разных цветов показаны надвторичные структуры A-домена: желтой – ФСК, фиолетовой – β2β3-петля, розовой – N3A-мотив, пурпурной – фрагмент B/C-спирали. Зеленым цветом выделены аминокислотные остатки ФСК L203 и I204, оранжевым цветом – аминокислотные остатки N3A-мотива L135 и F136. Набором цветов в соответствии с образующими его атомами окрашен остаток B/C-спирали Y229. Стрелкой указано направление смещения N3A-мотива. Изменение положения B/C-спирали, о котором можно судить по рисунку, не входит в событие B и будет рассмотрено в разделе 6.3.3

Рисунок 6.3 – Событие B. Смещение N3A-мотива в сторону от ФСК

Изменения значений всех трех названных параметров (расстояния между Cα атомами L135 и I204; энергии взаимодействия между L135, F136 и Y229; энергии взаимодействия между L203, I204 с одной стороны и L135, F136 с другой стороны) в совокупности с $RMSD_B$(N3A) характеризуют полноту реализации события В.

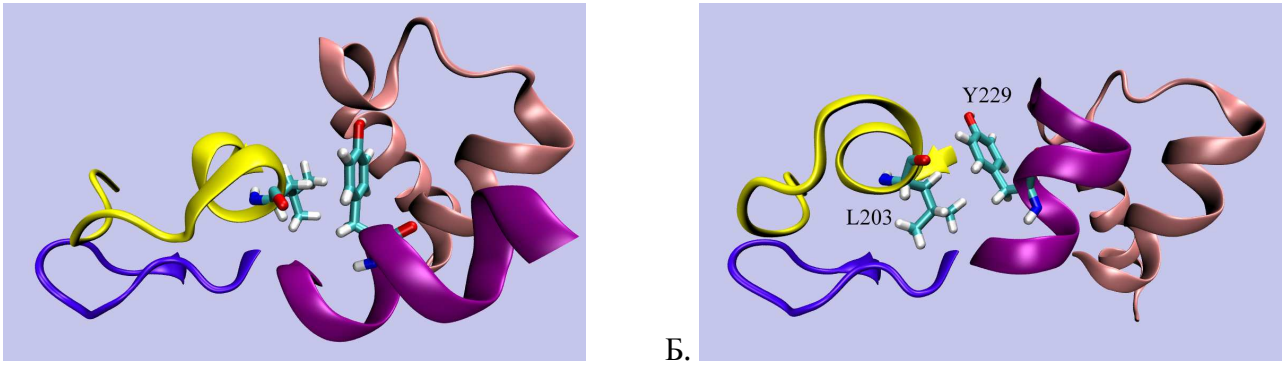
6.3.3. События, в основе которых лежит конформационное изменение B/C-спирали

На протяжении перехода А-домена из Н- в В-конформацию самые масштабные изменения претерпевает B/C-спираль. Не останавливаясь на конкретных взаимодействиях, происходящие с ней процессы можно описать как поворот единой B/C-спирали вокруг ее N-конца и образование излома, ведущего к появлению отдельных B- и C-спиралей.

Поворот B/C-спирали на угол равный 45° вокруг ее N-конца в плоскости рисунка (рисунок 6.4) был выделен нами как событие Г и отмечен желтым цветом на схеме 6.1. Запускается он упаковыванием L203 в гидрофобный карман, происходящим в рамках события Б. Было замечено [30, 33], что в Н-конформации боковая цепь L203 как бы упирается в ароматическое кольцо остатка B/C-спирали Y229, препятствуя ее вращению (рисунок 6.4 А). После того как боковая цепь L203 оказывается в гидрофобном кармане, это препятствие снимается, и спираль поворачивается на названный угол (рисунок 6.4 Б). Данные нашего моделирования полностью подтверждают такие наблюдения, но в то же время позволяют внести коррективы в формулировку причины поворота B/C-спирали. В соответствии с нашими результатами его движущей силой сначала является сохранение взаимодействия между Y229 и L203, а затем повышение энергии взаимодействия Y229 с β-субдоменом в целом. Действительно, в первый момент после упаковывания боковой цепи L203 в гидрофобный карман взаимодействие между Y229 и L203 находится под угрозой разрыва, но потом оно быстро восстанавливается благодаря частичному повороту B/C-спирали (20 – 30°), приближающему Y229 к β-субдомену. Дальнейший поворот B/C-спирали сопряжен с реализацией события Д, суть которого достижение максимально выгодного (с точки зрения энергии) положения Y229 относительно аминокислотных остатков β-субдомена (L203, I204, E200, F172), а также со смещением N3A-мотива, происходящим в рамках события В. Последний процесс оказывает влияние на поворот B/C-спирали по той причине, что N3A-мотив в Н-конформации А-домена и B- и C-спирали в В-конформации занимают одну и ту же область пространства.

Естественной мерой поворота B/C-спирали, очевидно, является угол между направлениями ее оси в Н-конформации и в рассматриваемой конформации. Однако рассчитывать этот угол на каждом шаге моделирования оказалось технически сложно. В качестве доступной меры, характеризующей состояние B/C-спирали мы выбрали $RMSD_B$(B/C-h). Существует всего два события, которые может определять этот параметр:

поворот B/C-спирали и ее излом. Анализ всех промоделированных переходов показал, что в первом приближении поворот B/C-спирали завершается до того момента, как начинает формироваться излом. Поэтому можно допустить, что изменение значений параметра $RMSD_B$(B/C-h) в начале пути перехода свидетельствует о повороте B/C-спирали (событие Г), а в конце перехода, наряду с изменениями значений других параметров, описывает образование отдельных B- и C-спиралей (событие И).



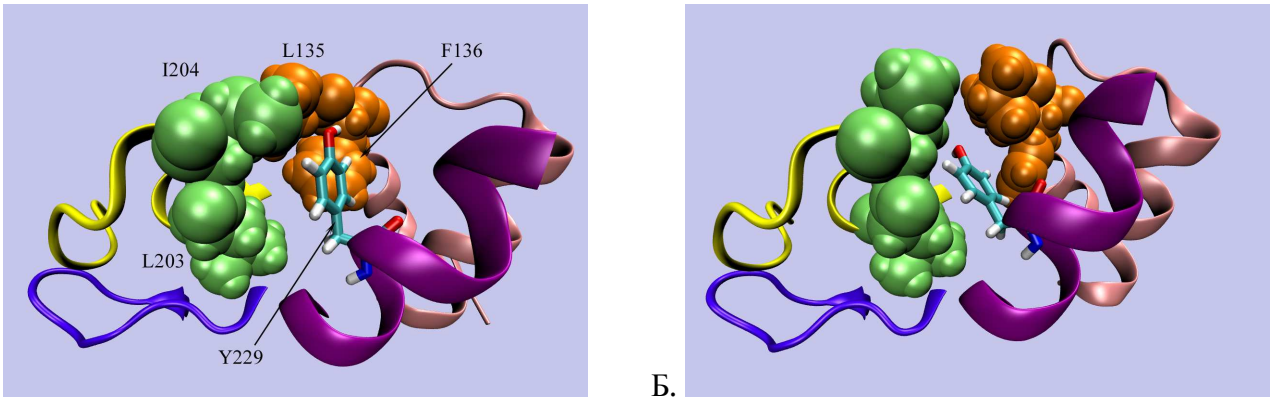
А – H-конформация; Б – промежуточная структура на пути перехода A-домена из H- в B-конформацию: поворот B/C-спирали уже практически завершился, а излом, ведущий к образованию отдельных B- и C-спиралей еще не начал образовываться. Лентами разных цветов показаны надвторичные структуры A-домена: желтой – ФСК, розовой – N3A-мотив, пурпурной – фрагмент B/C-спирали, фиолетовой – β2β3-петля. Отмечены остатки L203 и Y229, обсуждаемые в тексте

Рисунок 6.4 – Событие Г. Поворот B/C-спирали

Как следует из схемы 6.1, события В и Г характеризуются варьирующей между путями перехода длительностью и неравномерностью протекания. Тем не менее некоторая закономерность в их реализации все же присутствует. Событие Д как бы разделяет оба события на два этапа. До события Д (первый этап) обязательно должен произойти поворот B/C-спирали на угол 20 – 30° и разрыв гидрофобного кластера, связывающего N3A-мотив и ФСК (без значительного увеличения расстояния между Cα атомами аминокислотных остатков L135 и I204). Этот этап в совокупности с событием Б создает условия для реализации события Д. Дальнейшее смещение N3A-мотива хотя и может произойти до события Д, однако в наших расчетах (в том числе не вошедших в работу) такое наблюдалось достаточно редко. Дальнейший поворот B/C-спирали является следствием события Д, а кроме того зависит от смещения N3A-мотива, если он до наступления события Д не достиг положения, свойственного B-конформации.

Главным участником события Д, выделенного на схеме 6.1 розовым цветом, является остаток B/C-спирали Y229. С самого начала конформационного перехода его гидрофобное окружение претерпевает ряд существенных изменений. Во-первых, боковая цепь остатка L203 погружается в гидрофобный карман (событие Б), что грозит разрывом ее взаимодействия с

остатком Y229. Но сохранение этого взаимодействия оказывается выгодней разрыва, поэтому происходит сближение Y229 с β-субдоменом, возможное благодаря повороту B/C-спирали (часть события Г). Во-вторых, N3A-мотив, начав смещаться, (часть события В) уменьшает вклад остатков L135 и F136 в гидрофобное окружение Y229: контакты между ними и Y229 начинают разрываться по мере удаления N3A-мотива от ФСК (рисунок 6.3). Однако отодвигаясь, эти остатки перестают экранировать от Y229 остатки β-субдомена F172, E200, L203 и I204 (первые два из них до смещения N3A-мотива экранированы полностью, а вторые два – частично, рисунок 6.5 А). Находясь в непосредственной близости от названных остатков β-субдомена в результате событий Б и Г и имея доступ к ним вследствие события В, Y229 приобретает возможность увеличить энергию своего взаимодействия с β-субдоменом. Эту возможность он и реализует в рамках события Д. Структурное изменение, отвечающее событию Д, показано на рисунке 6.5 и состоит в том, что ароматическое кольцо Y229 как бы ложится на боковую цепь L203, приближаясь при этом и к остаткам E200, I204 и F172 (рисунок 6.5 Б). В результате реализации события Д энергия взаимодействия между Y229 и названными аминокислотными остатками β-субдомена увеличивается примерно в два раза.



А – Фрагмент А-домена перед совершением события Д; Б – Фрагмент А-домена после совершения события Д. Лентами разных цветов показаны надвторичные структуры А-домена: желтой – ФСК, розовой – N3A-мотив, пурпурной – фрагмент B/C-спирали, фиолетовой – β2β3-петля. Отмечены остатки L203, I204, L135, F136 и Y229, обсуждаемые в тексте

Рисунок 6.5 – Событие Д: достижение максимально выгодного (с точки зрения энергии) положения Y229 относительно аминокислотных остатков β-субдомена L203, I204, E200 и F172

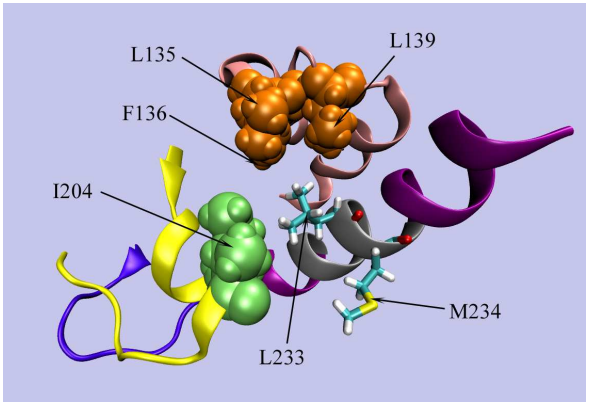
Изучая активацию белка EPAC, Хольгер Рехманн предположил и экспериментально доказал, что в основе конформационных переходов цАМФ-связывающих доменов лежит шарнирный механизм, представленный подвижным соединением B/C-спирали и β-субдомена [30, 33]. В H-конформации поворот B/C-спирали заблокирован положением L203, боковая цепь которого как бы упирается в ароматическое кольцо Y229. При связывании лиганда L203 смещается, шарнир оказывается разблокированным, и B/C-спираль поворачивается на необходимый угол. В работах других авторов, ссылающихся на данные Рехманна, процессам

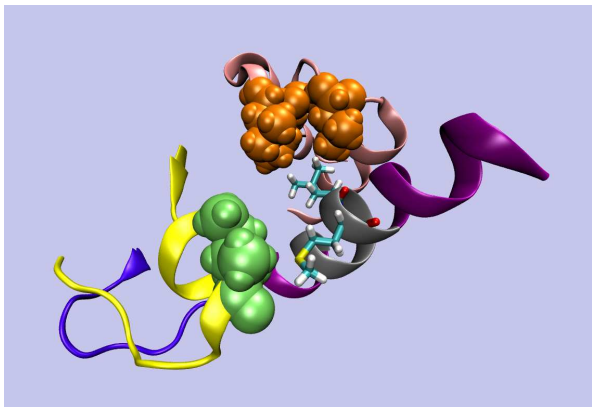
снятия и постановки блока на шарнир дали название гидрофобного «переключателя».

Сравнивая наши результаты с результатами Рехманна, нельзя не заметить, что гидрофобному «переключателю» в общих чертах соответствует последовательность событий Б, Г и Д, которая всегда наблюдается на пути перехода А-домена из Н- в В-конформацию. Таким образом, нам удалось подтвердить, что гидрофобный «переключатель» является обязательным элементом конформационного перехода, по крайней мере, А-домена ПКА Iα. Используя преимущества методов молекулярного моделирования, мы также внесли некоторые дополнения в модель Рехманна. Во-первых, мы объяснили причины смещения боковой цепи L203 в ответ на связывание лиганда, во-вторых – связали поворот B/C-спирали с сохранением взаимодействия L203 иY229 и, наконец в-третьих – указали на необходимость смещения N3A-мотива для функционирования гидрофобного «переключателя» в полную меру. Вопрос о том, почему в экспериментах Рехманна не наблюдалось блокирование гидрофобного «переключателя» N3A-мотивом, снимается сравнением моделей исследования. Рехманн работал на белках EPAC, у которых N3A-мотив и в Н- и В-конформации занимает одно и то же положение в удалении от ФСК (подробнее раздел 6.4.2).

Событие Е, показанное на схеме 6.1 зеленым цветом, может произойти сразу за событием Б, но с гораздо большей вероятностью следует за событием Д. Заключается оно в переходе фрагмента B/C-спирали (Y229 – G235) в π-форму, сопровождаемом поворотом боковой цепи L233 к гидрофобным остаткам N3A-мотива и β-субдомена (L135, F136, L139, F172), а боковой цепи M234 к остатку ФСК I204 (рисунок 6.6). Можно предположить, что причиной события Е является стремление L233 и M234 к созданию выгодного гидрофобного окружения и увеличению таким образом энергии своего взаимодействия с близлежащими остатками. В таком случае образование фрагмента π-спирали является вынужденной мерой, призванной за счет уменьшения кривизны витка спирали обеспечить правильное положение боковых цепей L233 и M234.

Реализацию события Е мы наблюдали по коррелированному изменению значений шести параметров: два из них – энергии взаимодействия остатков L233 и M234 с образующимся гидрофобным окружением (L233 с L135, F136, L139 и F172, а M234 с I204), два других – водородные связи, характерных для α-спирали R230(C=O)–M234(N-H), R231(C=O)–G235(N-H) и два оставшихся – водородные связи, характерные для π-спирали Y229(C=O)–M234(N-H), R230(C=O)–G235(N-H). В ходе реализации события Е названные энергии увеличивались, водородные связи, свойственные α-спирали разрывались, а свойственные π-спирали – образовывались.

А. 

Б. 

А – Фрагмент А-домена перед совершением события Е; Б – Фрагмент А-домена после совершения события Е. Лентами разных цветов показаны надвторичные структуры А-домена: желтой – ФСК, розовой – N3A-мотив, пурпурной –B/C-спираль, фиолетовой – β2β3-петля. Серым цветом обозначен виток B/C-спирали, претерпевающий переход в π-форму. Отмечены остатки I204, L135, F136, L139, L233 и M234, обсуждаемые в тексте

Рисунок 6.6 – Событие Е: переход фрагмента B/C-спирали (Y229 – G235) в π-форму, сопровождаемый поворотом боковой цепи L233 к N3A-мотиву, а боковой цепи M234 к ФСК

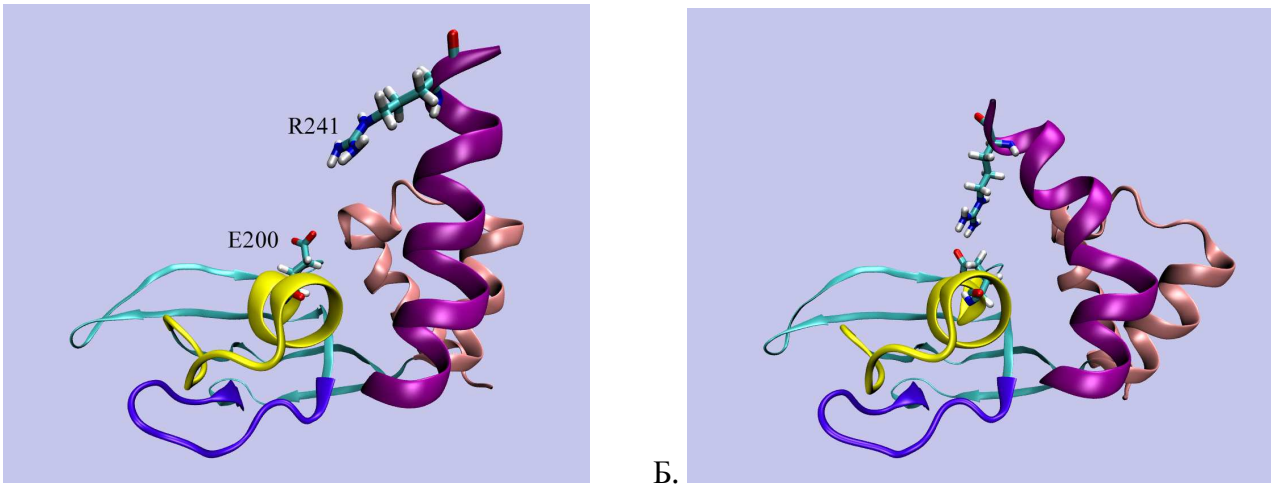
Важным последствием события Е является не только стабилизация положения N3A-мотива и B/C-спирали относительно друг друга и ФСК за счет возникших гидрофобных взаимодействий, но и предуготовление B/C-спирали к формированию излома.

Событие И – последнее в череде событий, определяющих конформационный переход А-домена. На схеме 6.1 оно выделено бирюзовым цветом. Состоит событие И (рисунок 6.7) в формировании излома B/C-спирали и в образовании двух взаимодействий между получившейся C-спиралью и ФСК: сильного электростатического, между боковыми цепями R241 и E200, и слабого гидрофобного, между боковыми цепями L238 и I204 (последнее в наших расчетах реализовывалось не всегда). Оба взаимодействия, но главным образом, конечно, электростатическое, поддерживают достигнутый угол между B- и C-спиралями, о чем говорит восстановление единой B/C-спирали после разрушения связи R241–E200, показанное в серии компьютерных расчетов [36]. По результатам этих расчетов можно сделать вывод, что причиной формирования излома B/C-спирали является сближение боковых цепей R241 и E200 при образовании взаимодействия между ними. Подтверждает этот вывод структура, приведенная на рисунке 6.7 А. Она иллюстрирует тот факт, что хотя оба остатка находятся в вытянутой конформации, в отсутствие излома или изгиба спирали расстояние между ними остается достаточно большим.

Особый интерес представляет собой участок B/C-спирали, на месте которого формируется излом. Дело в том, что α-спираль – достаточно стабильная структура, и сломать ее сложно даже при помощи электростатического взаимодействия. Но фрагмент π-спирали гораздо менее устойчив, поэтому излом появляется на месте витка π-спирали, а первым остатком C-спирали оказывается G235. В таком случае образно можно сказать, что сближение боковых

цепей R241 и E200 ломает стержень B/C-спирали в том месте, где он уже был надломлен.

О протекании события И свидетельствует коррелированное изменение значений семи параметров. Во-первых, возрастают энергии взаимодействия боковых цепей R241 и E200, а также L238 и I204. Во-вторых, увеличиваются расстояния между атомами R231(C=O) и G235(N-H), R230(C=O) и G235(N-H), R231(C=O) и S236(N-H), I232(C=O) и S236(N-H), маркируя собой место излома. И наконец в-третьих, последний раз за переход уменьшается $RMSD_B$(B/C-h). В целой R-субъединице, помимо перечисленных изменений, событие И должно включать в себя также образование стэкинг-взаимодействия между ароматическим кольцом лиганда и остатком N3A-мотива B-домена W260 (кэпом) [54]. Но так как мы рассматриваем отдельный A-домен, кэпирования аденина в наших моделированиях не происходит.



А – A-домен перед совершением события И; Б – A-домен после совершения события И (B-конформация). Лентами разных цветов показаны надвторичные структуры A-домена: бирюзовой – β-субдомен, кроме ФСК и β2β3-петли, желтой – ФСК, розовой – N3A-мотив, пурпурной –B/C-спираль, фиолетовой – β2β3-петля. Отмечены остатки R241 и E200, обсуждаемые в тексте

Рисунок 6.7 – Событие И: формирование излома B/C-спирали на месте фрагмента π-спирали, сопровождаемое образованием взаимодействия между боковыми цепями R241 и E200

Конформация A-домена, образовавшаяся после завершения события И, по совокупности всех признаков является B-конформацией. Более подробно вопрос сопоставимости полученных нами данных с данными рентгеноструктурного анализа освещен в разделе 6.1.

6.4. Описание первого приближения к пути минимальной свободной энергии (ПМСЭ) перехода A-домена из H- в B-конформацию

На основании данных, приведенных на рисунке 6.1, а также учитывая все изложенные в разделе 6.3 закономерности в наступлении событий, можно предложить следующую обобщенную схему перехода A-домена из H- в B-конформацию: 1) Б, 2) B1+(B2), Г1, (E), 3) Д, 4) Г2[(B2)], (**E**), 5) И. В этой схеме переход к каждому последующему пункту соответствует

развитию процесса во времени. События, указанные в одном пункте, могут наступать в произвольной последовательности, в том числе одно на фоне другого. Напротив, для событий, указанных в разных пунктах, действует определенный порядок: каждое из событий последующего пункта может наступать одновременно с событиями предыдущего пункта, но не ранее их. Метками "1" и "2" обозначены два этапа в реализации событий В и Г, о которых говорилось в разделе 6.3.3. В скобки взяты события, совершение которых в рамках данного пункта необязательно. Наиболее вероятное положение события Е в череде других событий выделено жирным шрифтом. Запись Г2[(В2)] сделана в соответствии с данными, изложенными в предыдущем разделе, и означает, что на этом этапе протекание события Г зависит от протекания события В, если последнее не завершилось на предыдущих этапах конформационного перехода.

Простым описанием к приведенной схеме может служить представление перехода А-домена из Н- в В-конформацию в виде трех последовательных этапов. На первом этапе (пункт 1 вышеуказанной) в ответ на связывание лиганда В-конформацию принимает ФСК. На втором этапе (пункты 2-4), благодаря смещению N3A-мотива и упаковыванию боковой цепи L203 в гидрофобный карман, образованный β2β3-петлей, поворачивается B/C-спираль, а в ее структуре, вследствие стремления остатков L233 и M234 к более выгодному гидрофобному окружению, формируется виток π-спирали. На третьем заключительном этапе (пункт 5) в результате сближения боковых цепей R241 и E200 на месте витка π-спирали образуется излом, который разделяет B/C-спираль на отдельные B- и C-спирали.

Учтя наблюдаемые нами (рисунок 6.1) тенденции ряда событий происходить на более коротком отрезке пути, чем они могли бы произойти, от обобщенной схемы перехода А-домена в В-конформацию можно перейти к более простой: 1) Б, 2) В1, Г1, 3) Д, 4) Г2[В2], Е, 5) И. Эта последовательность является первым приближением к пути минимальной свободной энергии (ПМСЭ). Ее уточнение и построение профиля свободной энергии вдоль уточненного ПМСЭ входит в планы наших дальнейших исследований конформационных переходов цАМФ-связывающих доменов.

В заключение этого раздела следует отметить, что единственный промоделированный нами путь перехода в В-конформацию А-домена с мутационной заменой R209K отличается от путей перехода доменов дикого типа не более, чем последние различаются между собой. Такие результаты полностью исключают участие электростатического «переключателя» R209–D170–R226 в конформационном переходе А-домена и подтверждают наши выводы, приведенные в главе 5, о причинах нарушения функционирования ПКА Iα при замене аргинина в 209-ом положении на другие аминокислотные остатки.

6.5. Обсуждение результатов

6.5.1 Связь изложенных результатов с существующими экспериментальными и расчетными данными

Исследование конформационных переходов белков является нестандартной задачей для применения экспериментальных методик. Расчетные методы более перспективны в ее решении, но и их использование сопряжено с рядом трудностей. Дело в том, что конформационные переходы относятся к классу редких событий в жизни каждого белка, протекание которых всегда сопровождается преодолением энтальпийных или энтропийных барьеров [110]. А следовательно, и расчетные методы, направленные на изучение конформационных переходов, должны представлять собой не способ моделирования естественного поведения системы во времени, а прием, позволяющий исследовать труднодоступные области энергетического ландшафта в приемлемые для исследователя сроки. Применять такие методы к большим несимметричным системам, каковыми являются белки, стали только в последние годы. Поэтому не удивительно, что конформационные переходы множества белков, в том числе и цАМФ-связывающих доменов, остались до сих пор практически не изученными.

Суммируя все имеющиеся в литературе данные, можно представить следующую картину, отражающую современное представление о конформационных переходах цАМФ-связывающих доменов. В первичных последовательностях этих доменов в соответствии с исследованиями, проведенными в лаборатории Сьюзен Тэйлор, присутствует четыре консервативных участка, отвечающих четырем надвторичным структурам: ФСК, β2β3-петле, N3A-мотиву и B-спирали [45]. Их консервативность предположительно говорит об их значимости для конформационного перехода, однако, в чем заключается роль каждой из структур, кроме ФСК, пока до конца не известно. ФСК, как следует из ее названия, связывает лиганд, причем основное участие в этом принимают пять ее аминокислотных остатков (в А-домене ПКА Iα – G199, E200, A202, R209 и A210) [6]. Эта функция ФСК была определена еще в 80-ых годах прошлого века, а основной вопрос, стоящий перед исследователями сейчас, заключается в определении одного (или нескольких) из этих остатков, посредством которых лиганд передает информацию о своем присутствии в связывающем сайте на отдаленные участки домена, то есть посредством которых запускается конформационный переход. В лаборатории Сьюзен Тэйлор было предположено, что этим остатком является R209 [5, 32, 65]. Действительно, R209 несет положительный заряд и, следовательно, участвует в сильном электростатическом взаимодействии с отрицательно заряженной фосфатной группой лиганда. Кроме того, от R209 берет начало цепочка аминокислотных остатков D170–R226, в которой боковая цепь D170 связана либо с R226 (в H-конформации), либо с R209 (в B-конформации). Так возникла модель электростатического

«переключателя» R209–D170–R226, полагающая начало конформационному переходу домена в изменении свойств R209 при связывании лиганда и следующем из этого переключении на R209 боковой цепи D170[27] [5, 32, 65, 105]. В качестве доказательств этой модели приводят дестабилизацию B-конформации у мутантов D170A [35] и блокирование конформационного перехода A-домена антагонистом ПКА Rp-цАМФS, происходящее, по предположению авторов модели, из-за нарушения свойств связи Rp-цАМФS с R209 [65]. К сожалению, модель электростатического «переключателя» не объясняет, каким образом происходит конформационный переход в отсутствии лиганда или в доменах, лишенных аспарагиновой кислоты в положении гомологичном D170 (подробнее в разделе 6.5.2). Также она игнорирует тот факт, что мутационные замены D170 и ряд мутационных замен R209 не нарушают конформационный переход A-домена [35, 105, 34]. И наконец, отсутствует самое главное, прямое, доказательство, демонстрирующее блокирование конформационного перехода при разобщении электростатического «переключателя». Одновременно с исследованиями, проводимыми в лаборатории Сьюзен Тэйлор, группе Хольгера Рехманна на модели цАМФ-связывающего домена белка EPAC удалось показать существование гидрофобного «переключателя» [30, 33]. Механизм его действия, по мнению Рехманна, основывается на том, что положения боковой цепи L203 (ФСК) в H- и B-конформациях различны. В H-конформации она как бы упирается в ароматическое кольцо Y229 (B/C-спираль), препятствуя повороту B/C-спирали, а в B-конформациии дает ему возможность осуществиться. Модель гидрофобного «переключателя» в отличие от модели электростатического «переключателя» доказана экспериментально: замена L203 на более объемный триптофан блокирует конформационный переход, а замены Y229 на аланин и треонин, напротив, дестабилизируют H-конформацию [33]. Однако в работах Рехманна не говорится о том, каким образом информация о связывании лиганда передается на L203, а значит вопрос о механизме, запускающем конформационный переход, остается открытым.

Внести ясность в эту картину, казалось бы, должны были расчетные работы. Таких работ было несколько [36, 44, 72], но только в одной из них проводились исследования отдельного цАМФ-связывающего домена (A-домена ПКА Iα) [36]. В этой работе была предпринята попытка методами стандартной молекулярной динамики показать переход A-домена R-субъединицы ПКА Iα из B- в H-конформацию. Для этого A-домен (а. о. 110 – 242) моделировался в NPT ансамбле в отсутствие лиганда в течение 40 нс. За время расчета происходил разрыв связи R241–E200 и, как следствие, образование единой B/C-спирали, что

[27] Вообще любой молекулярный «переключатель» должен представлять собой цепочку групп атомов, взаимодействие между которыми реализуется разными способами в зависимости от отсутствия или присутствия лиганда, а переключение между этими способами запускает конформационный переход.

соответствует показанному нами событию И, реализованному в обратном порядке. Дальнейшие события перехода авторам исследования показать не удалось, несмотря на то, что времена моделирования в их и нашей работе были сопоставимы. Таким образом, объяснений и дополнений к механизмам функционирования гидрофобного и электростатического «переключателя» в рамках этой работы получено не было.

Ответ на вопрос, почему нам удалось получить переход между конформациями, лежит не только в применении нами методов ускоренной молекулярной динамики, но и в удачной постановке задачи. Дело в том, что в отсутствие цАМФ переходы между Н- и В-конформациями А-домена оказываются довольно редким явлением, поэтому получить их трудно. Присутствие цАМФ в связывающем сайте понижает устойчивость Н-конформации и увеличивает таковую В-конформации, что приводит к увеличению и уменьшению соответственно частот Н→В и В→Н конформационных переходов. Поставив целью своей работы моделирование Н→В перехода в присутствии цАМФ, мы, таким образом, имели дело с наименее трудной задачей. Иллюстрацией этого факта служит то, что в четырех из тринадцати опытов В-конформация была достигнута без применения потенциалов уМД, то есть в рамках стандартной молекулярной динамики.

В результате, стартовав с удачной модели, мы смогли не только впервые промоделировать конформационный переход цАМФ-связывающего домена, но и ответить на существующие вопросы относительно механизмов функционирования электростатического и гидрофобного «переключателей».

Идея электростатического «переключателя» изначально являлась очень привлекательной для объяснения конформационных изменений цАМФ-связывающих доменов, так как фосфатная группа цАМФ несет отрицательный заряд, а в цАМФ-связывающем сайте имеется такой положительно заряженный центр как R209. Однако нам удалось показать, что переключение взаимодействий в цепочке R209–D170–R226 не играет роли в конформационном переходе А-домена, а только, вероятно, приводит к стабилизации реализовавшейся конформации. Тем не менее опровержение одной модели электростатического «переключателя» не означает отказа от самой идеи. Конформационный переход А-домена (и, видимо, других цАМФ-связывающих доменов) действительно запускается электростатическим «переключателем», и нам удалось его обнаружить. В А-домене ПКА Iα он представлен цепочкой цАМФ(O6)–A202(N-H)–G199(C=O). В ответ на связывание лиганда амидная группа A202 переключается с карбонильной группы G199 на атом кислорода O6 фосфатной группы цАМФ и этим запускает череду событий, приводящих в конечном итоге к достижению В-конформации. Одно из этих событий, упаковывание боковой цепи L203 в гидрофобный карман, является первым элементом гидрофобного «переключателя», открытого Хольгером Рехманном. То есть срабатывание

обнаруженного нами электростатического «переключателя» и есть тот самый механизм, который передает сигнал о связывании лиганда на гидрофобный «переключатель». Модель предложенную Рехманном нам удалось не только подтвердить, но и дополнить важными деталями, а кроме того мы показали, что не только гидрофобный «переключатель», но и другие гидрофобные взаимодействия играют важную роль в конформационном переходе А-домена (например, взаимодействие L233 с N3A-мотивом, приводящее к появлению витка π-спирали).

Ответив на большинство вопросов, поставленных экспериментальными работами, мы, тем не менее, не считаем нашу модель конформационного перехода А-домена исчерпывающей, так как отсутствие учета энергетических аспектов конформационных изменений свидетельствует о ее неполноте. Проведение соответствующих расчетов стоит в планах наших последующих исследований.

6.5.2. Применимость полученных результатов к другим цАМФ-связывающим доменам

В заключение проделанной работы представляется интересным оценить, насколько предложенный нами механизм перехода А-домена ПКА Iα из H- в B-конформацию применим к другим цАМФ-связывающим доменам. Для ответа на этот вопрос из базы третичных структур белков (PDB) мы выбрали все белки, имеющие в своем составе цАМФ-связывающие домены, конформационный переход в которых запускается циклическими нуклеотидами.

В банке третичных структур присутствуют и другие цАМФ-связывающие домены[28], например, гем-содержащие или управляемые хлорфенолами. Они входят в состав транскрипционных факторов прокариот и содержат все те же элементы вторичной структуры, что и цАМФ-связывающие домены, управляемые циклическими нуклеотидами. Итогом перехода в B-конформацию у тех и других доменов является поворот C-спирали, который передает информацию о случившемся изменении конформации на другие домены или белковые молекулы. Однако между названными доменами есть и существенное различие. У доменов, не имеющих сродства к циклическим нуклеотидам, нет ФСК, а следовательно, в лиганд-связывающем сайте происходят процессы, коренным образом отличающееся от описанных нами. По этой причине мы решили исключить такие структуры из нашего анализа, но не исключаем возможности и целесообразности их принципиального рассмотрения в совокупности с остальными цАМФ-связывающими доменами.

В результате, среди выбранных нами белков оказались транскрипционные факторы прокариот (CAP и другие), HCN каналы (собственно HCN и spIH), CNG каналы, белок EPAC2 и широкий спектр протеинкиназ А. Возможность проанализировать межвидовые и

[28] В данном случае определение «цАМФ-связывающие» - лишь часть названия, отражающее высокую степень гомологии с истинно цАМФ связывающими доменами.

внутривидовые различия последних появилась благодаря фундаментальной работе Canaves и соавторов [24], которые выравнили аминокислотные последовательности А и В доменов ПКА от альвеолят до позвоночных. В приведенных ими последовательностях, а также в отобранных нами третичных структурах, мы искали аминокислотные остатки, гомологичные тем, которые выделили как ключевые для А-домена ПКА Iα, а также другие, имеющие, на первый взгляд, решающее значение для конформационных переходов цАМФ-связывающих доменов. Полученные в результате данные мы представили в виде таблицы (таблица 6.2).

Как видно из приведенного материала, все рассмотренные цАМФ-связывающие домены нам удалось разбить на три типа. К первому типу относятся домены транскрипционных факторов прокариот, А-домен белка EPAC и домены HCN и CNG каналов. Второй тип представлен А-доменами ПКА и В-доменом белка EPAC. Третий тип доменов образуют только В-домены протеинкиназ А. Эволюция, по нашим представлениям, шла от первого типа доменов к третьему. Но поскольку для оценки соответствия наших взглядов истине нужны дополнительные исследования, мы ограничились только описанием выявленных типов доменов с указанием на возможные механизмы их конформационных переходов.

В первом типе цАМФ-связывающих доменов (рисунок 6.9 А) можно выделить два подтипа. Наиболее примитивным из них представляется подтип А, в который входят домены транскрипционных факторов прокариот и А-домен белка EPAC. ФСК этих доменов либо лишена четко выраженной спиральной структуры, либо даже в отсутствие лиганда близка к В-конформации. При этом для образования связи между лигандом и амидной группой гомолога A202 всегда требуется гораздо меньшее смещение последней, чем в случае А-домена ПКА Iα. Вместе с тем реализующуюся в таких доменах В-конформацию нельзя считать истинной, так как упаковывания гомолога L203 в гидрофобный карман при связывании цАМФ не происходит. Одна из возможных причин состоит в том, что остатки изолейцина и метионина, часто находящиеся на месте искомого лейцина, стерически не соответствуют форме кармана. Также вероятно, что взаимодействие с гидрофобным окружением за пределами кармана является для гомолога L203 более выгодными. В любом случае отсутствие упаковывания гомолога L203 в гидрофобный карман приводит к тому, что гидрофобный «переключатель» в доменах типа 1А не реализован, и поворота В-спирали в ответ на связывание лиганда не происходит[29]. N3A-

[29] Вместо ключевого взаимодействия, лежащего в основе гидрофобного «переключателя», (в А-домене ПКА Iα L203-Y229), в цАМФ-связывающих доменах типа 1А реализуется стабильный не зависящий от конформации белка гидрофобный кластер, состоящий из трех аминокислотных остатков: гомологов F172, Y229 и L203. Геометрия этого кластера в разных доменах неодинакова. Чаще всего наблюдается ситуация, когда каждый из трех остатков контактирует с двумя другими, но встречаются и отличные варианты. Например, у А-домена белка EPAC гомологи L203 и F172 между собой не контактируют, при этом боковая цепь гомолога Y229 располагается между ними, образуя с каждым из них тесные контакты. У CAP M.flagellatus и T.thermophilus не контактируют гомологи F172 и

мотив у рассматриваемых доменов или отсутствует или занимает то же положение, что в B-конформации A-домена ПКА Iα, то есть смещен в сторону от β-субдомена и ФСК и не образует в H-конформации контактов с последней. B-спираль доменов типа 1A длиннее на один остаток B-спирали A-домена ПКА Iα, а на ее C-конце находится аминокислотный остаток с торсионными углами, характерными для β-слоя (остаток β1, таблица 6.2). Наличие такого остатка приводит к появлению постоянного не зависящего от конформации белка излома между B- и C-спиралями, и B/C-спираль как единая структура у данного типа доменов не образуется. Во всех рассмотренных нами доменах типа 1A функцию кэпа (подробнее раздел 1.3.1) выполняет остаток аргинина, принадлежащий C-спирали. В зависимости от особенностей строения B- и C-спиралей его положению в пространстве над ароматическим кольцом лиганда могут соответствовать разные положения в первичной последовательности белка. При связывании лиганда искомый аргинин образует π-электронное взаимодействие с ароматическим кольцом последнего, вследствие чего C-спираль сближается с ФСК. Вероятно, это движение является единственно возможным для доменов типа 1A, и названный процесс представляет собой механизм конформационного перехода этих доменов. У транскрипционных факторов прокариот на C-конце C-спирали располагается ДНК-связывающий домен, а обладают активностью такие факторы только в составе гомодимера. Движение C-спиралей в ответ на связывание цАМФ вызывает изменение положения ДНК-связывающих доменов друг относительно друга, в результате чего транскрипционный фактор приобретает способность взаимодействовать с ДНК.

Согласно нашим представлениям, цАМФ-связывающие домены, не управляемые циклическими нуклеотидами, имеют сходное строение с доменами типа 1A, и на связывание лиганда отвечают таким же изменением конформации. Отличительной их особенностью является лишь отсутствие ФСК.

К доменам первого типа подтипа Б относятся цАМФ-связывающие домены HCN и CNG каналов. Визуально они похожи на домены подтипа A, однако между теми и другими есть существенные различия. Во-первых, остатком гомологичным L203 у доменов типа 1Б является лейцин. В B-конформации он всегда упакован в гидрофобный карман, что приводит к возникновению гидрофобного «переключателя» и приобретению B-спиралью способности поворачиваться в ответ на связывание лиганда. Во-вторых, N3A-мотив доменов этого типа смещен в сторону от ФСК только в B-конформации, а в H-конформации образует такой же

Y229, а связь между ними осуществляет гомолог L203. Последний случай наиболее интересен, так как, если предположить, что домены типа 1A являются предковыми для остальных цАМФ-связывающих доменов, то именно из гидрофобного кластера такой геометрии мог развиться гидрофобный «переключатель». Стоит отметить, что вклад F172 в гидрофобное окружение Y229 сохраняется и в A-домене ПКА Iα. Энергию взаимодействия Y229 с ФСК и β-субдоменом мы рассчитывали с учетом этого факта.

контакт с ней, как и в А-домене ПКА Iα. Исходя из названных особенностей строения доменов типа 1Б, их переход из Н- в В-конформацию, вероятно, должен происходить в три этапа. На первом этапе в ответ на связывание лиганда В-конформацию принимает ФСК. На втором – за счет срабатывания гидрофобного «переключателя» и смещения N3A-мотива поворачивается В-спираль. На третьем этапе образуется π-электронное взаимодействие между аргинином С-спирали, выполняющим функцию кэпа, и ароматическим кольцом лиганда, в результате чего С-спираль сближается с ФСК. Если сравнивать этот гипотетический механизм конформационного перехода с механизмом, предложенным нами для А-домена ПКА Iα, можно заметить, что существенные различия между ними проявляются только на втором этапе. На этом этапе у А-домена ПКА Iα помимо поворота B/C-спирали и смещения N3A-мотива формируется участок π-спирали. На его месте впоследствии образуется излом, разделяющий B/C-спираль на две отдельные В- и С-спирали. У доменов типа 1Б эти спирали и так существуют как отдельные структуры, так как во всех конформациях между ними находится шарнирный остаток β1 (см. домены типа 1А, таблица 6.2, рисунок 6.8 А), и дополнительных стадий, приводящих к их разделению, не требуется.

Для второго типа цАМФ-связывающих доменов (рисунок 6.8 Б, В), к которым относится и рассмотренный нами А-домен ПКА Iα, характерны работающий гидрофобный «переключатель» и отсутствие β1 остатка, превращающее В- и С-спирали в единую B/C-спираль. Положение N3A-мотива в данном типе доменов может различаться. У В-домена EPAC2 он, независимо от конформации, смещен в сторону от ФСК и не образует с ней контактов. У рассмотренных нами структур А-доменов протеинкиназ А N3A-мотив в Н-конформации взаимодействует с ФСК, а в В-конформации отодвигается от нее, как описано выше (раздел 6.3.2). Конформационный переход доменов второго типа детально изложен в разделах 6.2 – 6.4 на примере А-домена ПКА Iα.

В заключение описания первого и второго типов цАМФ-связывающих доменов необходимо остановиться на факте, который, на наш взгляд, имеет исключительное значение для установления путей их эволюции. Этим фактом является принадлежность А- и В-доменов белка EPAC2 к разным типам цАМФ-связывающих доменов при высокой степени гомологии их первичных последовательностей. Схожесть первичных последовательностей этих доменов предположительно говорит об их происхождении путем дупликации. А различия третичной структуры и механизмов конформационных переходов несут в себе информацию о тех событиях, которые впоследствии произошли с каждым из доменов.

В-домены протеинкиназ А относятся к третьему выделенному нами типу цАМФ-связывающих доменов (рисунок 6.8 Г, Д). Основной чертой, отличающей их от доменов второго типа, является отсутствие единой B/C-спирали в совокупности с особым строением шарнирного

участка между B- и C-спиралями, не встречающимся в ранее рассмотренных доменах. Предваряет шарнир остаток, гомологичный L233. Его боковая цепь всегда повернута к N3A-мотиву, как в B-конформации A-домена ПКА Iα. Однако вследствие C-концевого положения этого остатка в B-спирали, π-спиральный участок в ней не образуется. Следующие за гомологом L233 два остатка (G и P/N) формируют собственно шарнир. В H-конформации значения φ и ψ торсионных углов глицина составляют 70° и 180° соответственно, а значения φ и ψ торсионных углов P/N характерны для β-слоя. В B-конформации оба остатка шарнира переходят в α-спиральную форму. Таким образом, N-концевым остатком C-спирали в B-конформации является глицин шарнира, а в H-конформации – остаток, следующий за P/N. У некоторых доменов третьего типа, кроме описанного шарнира, существует еще один, представленный аминокислотным остатком с торсионными углами, характерными для β-слоя (остаток β2, таблица 6.2). Он располагается в C-концевой области C-спирали и, если следующие за ним остатки образуют α-спираль, то она носит название C`. В B-конформации C- и C`-спирали объединяются в единую спираль, фигурирующую в литературе под названием C-спирали. Конформационный переход доменов третьего типа с учетом перечисленных особенностей их структуры должен включать в себя три обязательных этапа: 1) связывание лиганда и переход ФСК в B-конформацию, 2) поворот B-спирали, вследствие срабатывания гидрофобного «переключателя» и смещения N3A-мотива, и изменение конформации шарнира, 3) образование π-электронного взаимодействия между ароматическими кольцами лиганда и остатка кэпа, сопровождающееся объединением C- и C`-спиралей и сближением итоговой C-спирали с ФСК. Стоит отметить, что уникальными чертами предложенного гипотетического механизма являются только изменение конформации шарнира и объединение C- и C`-спиралей. Все остальные события свойственны цАМФ-связывающим доменам других типов и детально изучены в нашей работе.

Обобщая данные, приведенные в таблице 6.2, можно сказать, что у всех типов цАМФ-связывающих доменов есть общие черты строения и определяемые ими общие этапы перехода из H- в B-конформацию. В этом смысле можно утверждать, что предпринятое нами молекулярное моделирование вносит вклад в понимание механизма функционирования не только ПКА Iα, но и широкого спектра белков, включающего в себя транскрипционные факторы прокариот, ионные каналы, белки EPAC и другие, возможно, пока неизвестные белки, в состав которых входят цАМФ-связывающие домены. Однако у рассмотренных доменов есть и уникальные черты строения, приводящие к появлению уникальных стадий конформационного перехода. Все участки первичной последовательности, образующие такие уникальные структуры, расположены с C-конца от гомолога L233 и включают в себя область C-спирали и предваряющего ее шарнира. Исследование изменений конформаций этих структур необходимо

для понимания функционирования каждого конкретного домена. А поиск гомологии между их аминокислотными последовательностями может пролить свет на эволюцию цАМФ-связывающих доменов.

В заключение данного раздела диссертации имеет смысл еще раз вернуться к вопросу электростатического «переключателя» R209–D170–R226, чтобы оценить его роль в функционировании цАМФ-связывающих доменов с учетом вариантов их строения. Как видно из приведенных в таблице 6.2 данных, электростатический «переключатель» присутствует только в А-доменах протеинкиназ А, в которых, однако, за редким исключением является обязательным элементом. Возможное объяснение такому избирательному присутствию электростатического «переключателя» в А-доменах ПКА можно предложить с позиций установленной нами его функции как стабилизатора конечных конформаций цАМФ-связывающих доменов. Вероятно, что В-домен ПКА, расположенный на С-конце С-спирали А-домена, понижает устойчивость В-конформации А-домена. Дополнительная стабилизация В-конформации с помощью электростатического «переключателя» в этом случае становится необходимой.

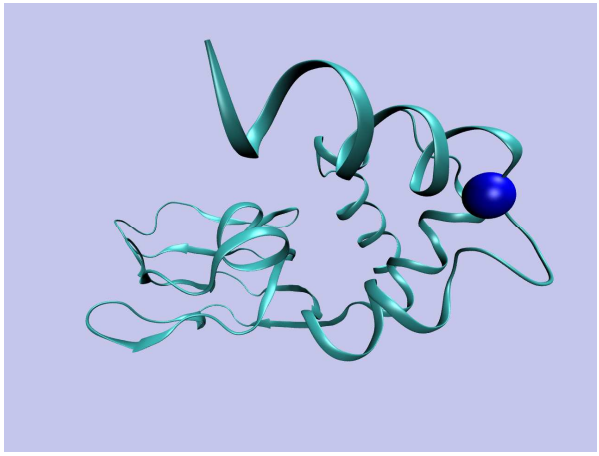
Таблица 6.2 – Типы цАМФ-связывающих доменов

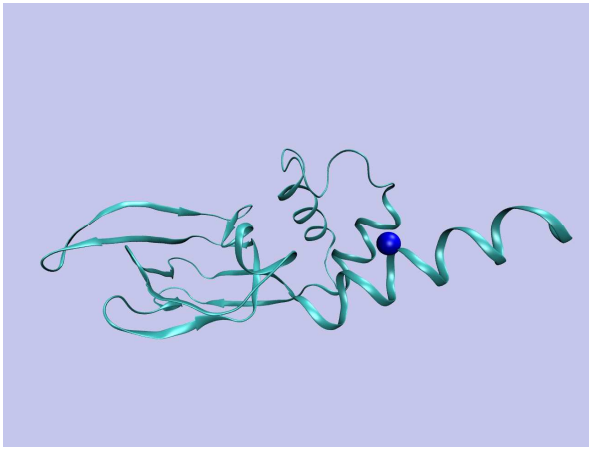
описание домена					Область гомологии между типами доменов						
	белок		организм	PDB ID H/B	N3A-мотив			β2β3-петля			э/п
Первый тип А	факторы транскрипции	CAP	E.coli	3HIF/ 1G6N	–	–	–	A36	E37	L39	N
		CAP	M.tuberculosis	3D0S/ 4A2U	I10	F11	V14	G44	D45	L47	N
		Virulence	P.aeruginosa	/2OZ6	–	–	–	C38	E39	L41	N
		CAP	M.flagellatus	/3GYD	–	–	–	G61	D62	L64	N
		CAP	T.thermophilus	/4EV0	L6	F7	L10	G40	Q41	L43	N
		GLXR	C.glutamicum	4BYY/ 3R6S	I13	F14	V17	G47	D48	L50	N
	EPAC2	A-домен	M.musculus	2BYV/	A43	F44	F47	G77	T78	W80	N
Первый тип Б	CNG		M.loti	3CO2/ 1VP6	L235	F236	L239	G269	D270	M272	N
	HCN	HCN2	M.musculus	/1Q43	L517	F518	A521	G551	K552	M554	N
		HCN2	H.sapiens	/3U10	L544	F545	A548	G578	K579	M581	N
		HCN4	H.sapiens	/3OTF	L595	F596	A599	G629	K630	M632	N
		HCN1	M.musculus	/3UOZ	L464	F465	A468	G498	K499	M501	N
		spIH	S.purpuratus	/2PTM	F545	F546	A549	G579	D580	M582	N
Второй тип	EPAC2	B-домен	M.musculus	2BYV/ 3CF6	A338	L339	L342	G373	T374	W376	N
	A-домены ПКА	**Iα**	**M.musculus B.taurus**	**2QCS/ 1NE6**	**L135**	**F136**	**L139**	**G169**	**D170**	**F172**	**Y**
		IIα	M.musculus	2QVS/	L135	F136	L139	G169	D170	F172	NA
		IIβ	R.norvegicus	3TNQ/ 1CX4	L152	F153	L156	G186	D187	F189	Y
			S.cerevisiae	/3OF1	L184	F185	L188	G218	D219	F221	Y
			(по Canaves et.al, [24])		L/M	F	L	G	D/E/A	F/L	NA
Третий тип	B-домены ПКА	Iα	M.musculus B.taurus	2QCS/ 1NE6	I253	L254	L257	G287	D288	F290	N
		IIα	M.musculus	2QVS/	L257	F258	L261	A291	D292	F294	NA
		IIβ	R.norvegicus	3TNQ/ 1CX4	F274	L275	L278	A308	D309	F311	N
			S.cerevisiae	/3OF1	V302	L303	L306	G336	E337	F339	N
			(по Canaves et.al, [24])		I/L/V/ F/C	L/F/C	I/L/S/ V/M	G/A/ V	D/E/S/ N/H/T	F/C	NA

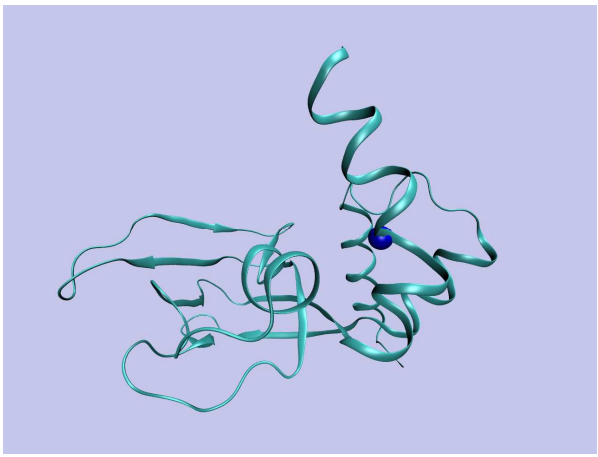
Окончание таблицы 6.2[30]

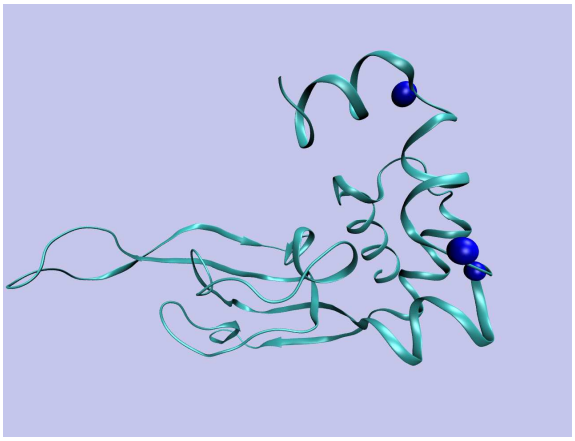
	Область гомологии между типами доменов								Область отсутствия видимой гомологии между типами доменов				
										С-спираль			
белок	ФСК			г/п	В-спираль				β1	1-ый ост.	2-ой ост.	β2	кэп
факторы транскрипции	G74	L75	F76	N	F102	I106			N109	P110		–	R123*
	S82	I83	A84	N	L109	I113			R116	P117		–	R130
	G76	L77	F78	N	F107	S111			D114	S115		–	R128
	S99	M100	I101	N	L126	L130			M133	P134		–	R151*
	S78	L79	L80	N	Y105	I109			L112	P113		–	R126
	S85	I86	F87	N	L112	V116			H119	P120		–	R133
EPAC2	–	I117	L118	N	F143	W147			Y150	R151		–	–
CNG	A300	L301	I302	Y	F327	C331			S334	P335		–	R348
HCN	C584	L585	L586	Y	F611	L615			Y618	P619		–	R632
	C611	L612	L613	Y	F638	L642			Y645	P646		–	R659
	C662	L663	L664	Y	F689	L693			Y696	P697		–	R710
	C531	L532	L533	Y	F558	L562			Y565	P566		–	R579
	C613	L614	L615	Y	F640	L644			F647	P648		–	R661
EPAC2	A407	L408	V409	Y	F435	L439	R440		–	D441		–	L449*
А-домены ПКА	**A202**	**L203**	**I204**	**Y**	**Y229**	**L233**	**M234**		**–**	**G235**		**–**	
	A206	L207	M208	Y	F233	I237	V238		–	K239		–	
	A223	L224	M225	Y	F250	I254	V255		–	K256		–	
	A251	L252	M253	Y	F278	L282	L283		–	G284		–	
	A	L	I/M/L	Y	Y/F	L/I/V	M/V/ L/F/K		–	G/D/ K/E		–	
В-домены ПКА	A326	L327	L328	Y	F353	L357	–		–	G358	P359	N367	Y371
	A336	L337	V338	Y	F363	L367	–		–	G368	P369	N377	Y381
	A352	L353	V354	Y	F379	L383	–		–	G384	P385	N393	Y397
	A370	L371	L372	Y	F397	L401	–		–	G402	P403	N411?	P413*
	A	L	L/V/I	Y	F	L/M/C /I	–		–	G	P/N	N/D/M/ Q/ –	Y/ –

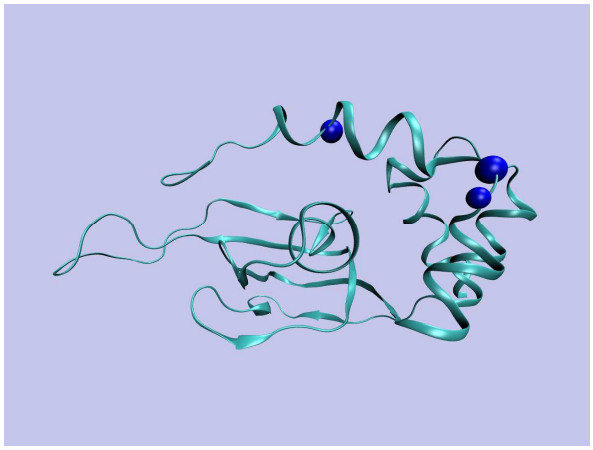
[30] Каждый тип домена выделен своим цветом: первый – оранжевым, второй – сиреневым, третий – оливковым. Область гомологии между доменами показана светлыми тонами, область отсутствия видимой гомологии – более темными, а аминокислотные остатки, формирующие излом,– самыми темными. В столбцах э/п и г/п (электростатический и гидрофобный «переключатели») «N» обозначает их отсутствие, «Y» - наличие, а «NA» означает отсутствие данных по этому вопросу. Звездочкой отмечены те аминокислотные остатки кэпа, которые не гомологичны остальным аминокислотным остаткам, формирующим кэп в этом типе доменов. Аминокислотные остатки, не существующие в рассматриваемом домене, отмечены прочерком. Пустыми оставлены ячейки, отведенные под аминокислотные остатки, не играющие, на наш взгляд, существенной роли в конформационном переходе рассматриваемого домена.

А. 

Б. 

В. 

Г. 

Д. 

А – Первый тип цАМФ-связывающих доменов на примере CNG канала. Б – Второй тип цАМФ-связывающих доменов на примере А домена ПКА Iα (Н-конформация). В – Второй тип цАМФ-связывающих доменов на примере А домена ПКА Iα (В-конформация). Г – Третий тип цАМФ-связывающих доменов на примере В домена ПКА Iα (Н-конформация). Д – Третий тип цАМФ-связывающих доменов на примере В домена ПКА Iα (В-конформация). Синими сферами выделены участки, где расположены аминокислотные остатки, образующие шарнир или излом.

Рисунок 6.8 – Типы цАМФ-связывающих доменов

6.6. Промежуточные выводы

1) Показаны цАМФ-индуцированные переходы из Н- в В-конформацию для тринадцати независимых А-доменов ПКА Iα, один из которых содержит мутационную замену R209K. О завершенности переходов судили по изменению RMSD доменов в целом и их надвторичных

структур (ФСК, N3A-мотива, B/C-спирали).

2) Конформационный переход A-домена запускается электростатическим «переключателем», представленным цепочкой цАМФ(O6)–A202(N-H)–G199(C=O). В ответ на связывание лиганда амидная группа A202 переключается с карбонильной группы G199 на атом кислорода O6 фосфатной группы цАМФ и этим запускает череду событий, приводящих в конечном итоге к достижению B-конформации.

3) Подтверждены выводы предыдущих глав о непричастности электростатического «переключателя» R209–D170–R226 к конформационному переходу A-домена.

4) Срабатывание электростатического «переключателя» цАМФ(O6)–A202(N-H)–G199(C=O) является механизмом, который передает сигнал о связывании лиганда на гидрофобный «переключатель» L203–Y229. Сигнал передается через упаковывание боковой цепи L203 в гидрофобный карман.

5) Движущей силой поворота B/C-спирали в рамках работы гидрофобного «переключателя» является на первых этапах сохранение взаимодействия между Y229 и L203, а затем повышение энергии взаимодействия Y229 с β-субдоменом в целом.

6) В A-домене ПКА Iα поворот B/C-спирали невозможен без смещения N3A-мотива, так как в этом и ряде других цАМФ-связывающих доменов N3A-мотив в H-конформации и B- и C-спирали в B-конформации занимают одну и ту же область пространства.

7) Помимо гидрофобного «переключателя», существуют и другие гидрофобные взаимодействия, которые играют важную роль в конформационном переходе A-домена (например, взаимодействие L233 с N3A-мотивом, приводящее к появлению витка π-спирали).

8) На основании полученных результатов переход A-домена из H- в B-конформацию можно представить в виде трех последовательных этапов. На первом этапе в ответ на связывание лиганда B-конформацию принимает ФСК. На втором этапе, благодаря смещению N3A-мотива и упаковыванию боковой цепи L203 в гидрофобный карман, образованный β2β3-петлей, поворачивается B/C-спираль, а в ее структуре, вследствие стремления остатков L233 и M234 к более выгодному гидрофобному окружению, формируется виток π-спирали. На третьем заключительном этапе в результате сближения боковых цепей R241 и E200 на месте витка π-спирали образуется излом, который разделяет B/C-спираль на отдельные B- и C-спирали. Эта схема является первым приближением к пути минимальной свободной энергии (ПМСЭ) между H- и B-конформациями A-домена ПКА Iα. Ее уточнение и построение профиля свободной энергии вдоль уточненного ПМСЭ входит в планы наших дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Характеристика перехода А-домена RIα из Н- в В-конформацию с позиций теорий индуцированного соответствия и отбора конформаций

С использованием метода докинга мы показали, что цАМФ-связывающий сайт А-домена RIα доступен для лигандов, даже если R-субъединица связана с С-субъединицей и поддерживает ее неактивное состояние. Для обоих агонистов (цАМФ и Sp-цАМФS) и обратного агониста Rp-цАМФS свободная энергия связывания с А-доменом, независимо от его конформации, оказалась существенно меньше нуля. Тем не менее с А-доменом в В-конформации все три лиганда формировали более устойчивые комплексы.

Такие результаты, в совокупности с экспериментально показанным увеличением скорости диссоциации R- и С-субъединиц в присутствии агонистов, говорят в пользу непосредственного участия цАМФ и Sp-цАМФS в переходе А-домена из Н- в В-конформацию, то есть указывают на преимущественное протекание активации ПКА Iα по пути индуцированного соответствия.

Механизм обратного агонизма Rp-цАМФS, в соответствии с приведенными результатами, также должен заключаться не в отборе Н-конформации А-домена, а в блокировании его перехода в В-конформацию. Этот факт имеет важнейшее значение для объяснения начальных этапов механизма цАМФ-индуцированных конформационных изменений А-домена.

цАМФ запускает переход А-домена RIα из Н- в В-конформацию посредством электростатического «переключателя» цАМФ(O6)–A202(N-H)–G199(C=O)

Полученные нами данные позволили выделить электростатический «переключатель» цАМФ(O6)–A202(N-H)–G199(C=O), посредством которого цАМФ передает информацию о своем связывании на гидрофобный «переключатель» L203–Y229 и этим запускает конформационный переход А-домена. Амидная группа A202 переключается с карбонильной группы G199 на атом кислорода O6 фосфатной группы цАМФ, что сопровождается смещением искомой амидной группы на расстояние около 2,5Å. Этот процесс приводит к переходу B`-спирали ФСК из 3_{10}- в α-форму и, как следствие, к упаковыванию боковой цепи L203 в гидрофобный карман, образованный β2β3-петлей. Последнее событие инициирует конформационные изменения, положенные Хольгером Рехманном [30, 33] в основу гидрофобного переключателя L203–Y229.

Ключевая роль электростатического переключателя цАМФ(O6)–A202(N-H)–G199(C=O) в переходе А-домена из Н- в В-конформацию находит подтверждение в предложенном нами

механизме функционирования Rp-цАМФS в качестве обратного агониста ПКА Iα. Согласно полученным в ходе исследования данным Rp-цАМФS, находясь в цАМФ-связывающем сайте, препятствует смещению амидной группы A202, в результате чего А-домен оказывается блокированным в Н-конформации.

Электростатический «переключатель» R209–D170–R226 не задействован в переходе А-домена RIα из Н- в В-конформацию

Проведенное исследование показало, что известный по литературным данным электростатический «переключатель» R209–D170–R226 [5, 32, 65, 105] не задействован в конформационном переходе А-домена из Н- в В-конформацию. В пользу отсутствия у него такой функции свидетельствуют: а) переход в В-конформацию домена с мутационной заменой R209I; б) восстановление способности домена с мутацией R209K к Н→В конформационному переходу как результат фиксации положения β2β3-петли и боковой цепи K209; в) отсутствие искомого «переключателя» во всех цАМФ-связывающих доменах, кроме А-доменов протеинкиназ А.

Согласно нашим представлениям, роль электростатического «переключателя» R209–D170–R226 сводится к дополнительной стабилизации В- и Н-конформаций А-домена с помощью водородных связей R209–D170 и R226–D170 соответственно.

Роль остатка R209 в активации ПКА Iα

Несмотря на то, что электростатический «переключатель» R209–D170–R226 не задействован в переходе А-домена из Н- в В-конформацию, R209 является инвариантным остатком, и замена его на близкий по свойствам лизин повышает константу активации ПКА Iα более чем на порядок. В ходе исследования мы установили, что за этим фактом стоит ряд важных функций, закрепившихся за остатком в 209-ом положении и не связанных с его участием в электростатическом «переключателе». К этим функциям относятся: (а) фиксация лиганда в связывающем сайте; (б) поддержание конформации β2β3-петли; (в) создание стерически благоприятных условий для размещения A202 в положении, характерном для В-конформации, и стабилизация этого положения путем образования взаимодействия между боковыми цепями A202 и R209. Согласно полученным результатам, аргинин наилучшим образом совмещает выполнение всех перечисленных функций, что способствует появлению устойчивого энергетического минимума, соответствующего В-конформации, и, вероятно, уменьшению высоты энергетического барьера перехода в него. Другие рассмотренные нами остатки оказываются не способными к выполнению той или иной из обозначенных функций, вследствие чего В-конформация становится менее устойчивой. Сила их дестабилизирующего влияния на В-конформацию в присутствии цАМФ увеличивается в ряду I<K<E(G), а в

отсутствие цАМФ – в ряду I<E<G<K. Сопоставление этих рядов с экспериментальными данными по активации ПКА Iα [34] дает основание полагать, что склонность к формированию B-конформации определяет корректное функционирование, как отдельных цАМФ-связывающих доменов, так и целого белка.

Дополнения к модели гидрофобного «переключателя» L203-Y229, предложенной Хольгером Рехманном

Проведенные нами исследования подтвердили, что гидрофобный «переключатель» L203–Y229 [30, 33] представляет собой обязательный элемент механизма, лежащего в основе перехода A-домена RIα из H- в B-конформацию. Согласно модели Рехманна, его переключение, индуцированное цАМФ, сводится к двум последовательным событиям: смещению боковой цепи L203, приводящему к снятию блока L203–Y229 с поворота B/C-спирали, и собственно повороту B/C-спирали. Используя преимущества методов молекулярного моделирования, мы внесли ряд дополнений в эту модель. Во-первых, мы установили, что смещение боковой цепи L203 (ее упаковывание в гидрофобный карман, образованный β2β3-петлей) происходит вследствие переключения взаимодействий в описанном нами электростатическом «переключателе» цАМФ(O6)–A202(N-H)–G199(C=O). Во-вторых мы определили, что движущей силой поворота B/C-спирали является на первых этапах сохранение взаимодействия между остатками Y229 и L203, а затем повышение энергии взаимодействия остатка Y229 с β-субдоменом в целом. В-третьих, мы указали на частичное смещение N3A-мотива по направлению от ФСК как на обязательное условие поворота B/C-спирали, без выполнения которого снятие блока с гидрофобного «переключателя» не является полным. Важно отметить, что последнее дополнение справедливо для всех цАМФ-связывающих доменов, кроме доменов белка EPAC, исследованием которых и занимался Рехманн. У этих доменов N3A-мотив и в H- и B-конформациях занимает одно и то же положение относительно ФСК и не блокирует поворот B/C-спирали.

Механизм перехода A-домена RIα из H- в B-конформацию

Основываясь на результатах проведенного нами моделирования, мы предложили следующую схему перехода A-домена RIα из H- в B-конформацию, представляющую собой частично детерминированную последовательность описанных нами событий: 1) Б, 2) В1, Г1, 3) Д, 4) Г2[В2], Е, 5) И.

Событие Б представляет собой переход ФСК из H- в B-конформацию, включая упаковывание боковой цепи L203 в гидрофобный карман. В рамках этого события работает описанный нами электростатический «переключатель» цАМФ(O6)–A202(N-H)–G199(C=O). Событие В заключается в смещении N3A-мотива в сторону от ФСК, событие Г – в повороте

B/C-спирали, а событие Д – в увеличении энергии взаимодействия остатка Y229 с β-субдоменом. События В и Г имеют тенденцию осуществляться в два этапа, для указания на которые введены метки "1" и "2", причем на втором этапе протекание события Г определяется событием В, что обозначено как Г2[В2]. Совокупность событий Б, В1, Г1 и Д соответствует дополненной нами модели гидрофобного «переключателя» Рехманна. Завершающие переход события Е и И специфичны для А-доменов протеинкиназ А и В-доменов белков EPAC. В основе события Е лежит переход фрагмента B/C-спирали из α- в π-форму и сопутствующее ему увеличение энергии взаимодействия B/C-спирали с ФСК и N3A-мотивом. Событие И заключается в образовании излома B/C-спирали на месте фрагмента π-спирали, а также в фиксации этого излома с помощью электростатического взаимодействия R241–E200 и в меньшей степени вандерваальсова взаимодействия L238–I204.

Очередности пунктов приведенной схемы соответствует реализация процесса конформационного перехода А-домена во времени. События, указанные в одном пункте, могут наступать в произвольной последовательности, в том числе одно на фоне другого. Напротив, для событий, указанных в разных пунктах, действует определенный порядок: каждое из событий последующего пункта может наступать одновременно с событиями предыдущего пункта, но не ранее их.

Простым описанием установленного механизма перехода А-домена RIα из Н- в В-конформацию может служить представление его в виде трех последовательных этапов. На первом этапе (пункт 1 вышеуказанной схемы) в ответ на связывание лиганда В-конформацию принимает ФСК. На втором этапе (пункты 2 – 4), благодаря смещению N3A-мотива и упаковыванию боковой цепи L203 в гидрофобный карман, образованный β2β3-петлей, поворачивается B/C-спираль, а в ее структуре, вследствие стремления остатков L233 и M234 к более выгодному гидрофобному окружению, формируется виток π-спирали. На третьем этапе (пункт 5) в результате сближения боковых цепей R241 и E200 на месте витка π-спирали образуется излом, который разделяет B/C-спираль на отдельные B- и C-спирали.

Последовательность событий, положенная нами в основу перехода А-домена RIα из Н- в В-конформацию, является первым приближением к пути минимальной свободной энергии (ПМСЭ) этого перехода. Ее уточнение и построение профиля свободной энергии вдоль уточненного ПМСЭ входит в планы наших дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1) цАМФ запускает переход А-домена регуляторной субъединицы ПКА Iα из Н- в В-конформацию посредством электростатического «переключателя» цАМФ(O6)–A202(N-H)–G199(C=O), передающего информацию о связывании цАМФ на гидрофобный «переключатель» L203–Y229.

2) Электростатический «переключатель» R209–D170–R226 не задействован в переходе А-домена регуляторной субъединицы ПКА Iα из Н- в В-конформацию. Однако аминокислотный остаток в положении 209 выполняет ряд важных функций, к которым относятся: (а) фиксация лиганда в связывающем сайте; (б) поддержание конформации β2β3-петли; (в) создание стерически благоприятных условий для размещения А202 в положении, характерном для В-конформации, и стабилизация этого положения путем взаимодействия с боковой цепью А202. Аргинин в положении 209 наилучшим образом совмещает выполнение всех перечисленных функций, что является причиной его инвариантности во всех цАМФ-связывающих доменах.

3) Гидрофобный «переключатель» L203–Y229 представляет собой обязательный элемент механизма, лежащего в основе перехода А-домена регуляторной субъединицы ПКА Iα из Н- в В-конформацию. Движущей силой поворота B/C-спирали, происходящего при его переключении, является на первых этапах сохранение взаимодействия между Y229 и L203, а затем повышение энергии взаимодействия Y229 с β-субдоменом в целом. В А-домене ПКА Iα, как и в ряде других цАМФ-связывающих доменов, для перехода гидрофобного «переключателя» в состояние, соответствующее В-конформации, необходимо смещение N3A-мотива от фосфат-связывающей кассеты.

4) Переход А-домена регуляторной субъединицы ПКА Iα из Н- в В-конформацию происходит в три последовательных этапа. На первом этапе в ответ на связывание лиганда В-конформацию принимает фосфат-связывающая кассета. На втором этапе происходит смещение N3A-мотива, поворот B/C-спирали и формирование в ее структуре витка π-спирали. На третьем этапе на месте витка π-спирали образуется излом, который разделяет B/C-спираль на отдельные B- и C-спирали.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

6-АН-цАМФ – циклический *N*6-(6-аминогексил)аденозин-3`,5`-монофосфат

8-АНА-цАМФ – циклический 8-(6-аминогексил)аминоаденозин-3`,5`-монофосфат

а. о. – аминокислотные остатки

МД – молекулярная динамика

ПКА – протеинкиназа А

ПКА Iα – протеинкиназа А Iα

ПКГ – протеинкиназа Г

ПКИ – протеинкиназы А ингибитор

ПМСЭ – путь минимальной свободной энергии

ПМЭ – путь минимальной энергии

уМД – ускоренная молекулярная динамика

ФСК – фосфат-связывающая кассета

цАМФ – циклический аденозин-3`,5`-монофосфат

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

С-субъединица – каталитическая субъединица

cAMP – обозначение цАМФ, используемое в двух случаях: 1) для обозначения концентрации цАМФ – [cAMP], 2) для обозначения лиганд-белковых комплексов (например, RcAMP – R-субъединица, в одном из цАМФ-связывающих сайтов которой находится цАМФ)

CAP – catabolite activator protein (белок-активатор катаболитных оперонов)

CNG – cyclic nucleotide-gated ion channels (каналы, активируемые циклическими нуклеотидами)

EPAC – exchange protein directly activated by cAMP (ГДФ/ГТФ обменный белок, напрямую активируемый цАМФ)

HCN – hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channels (гиперполяризационно-активируемые каналы, управляемые циклическими нуклеотидами)

PC – главная компонента (principle component) в факторном анализе

R-субъединица – регуляторная субъединица

RIα – регуляторная субъединица Iα

R_A – R-субъединица, содержащая только А-домен

R_{AB} – R-субъединица, содержащая оба цАМФ-связывающих домена

RC комплекс – неактивный комплекс R- и C-субъединиц

R_AC комплекс – RC комплекс, R-субъединица которого содержит только А-домен

$R_{AB}C$ комплекс – RC комплекс, R-субъединица которого содержит оба цАМФ-связывающих домена

RCcAMP – «тройной комплекс» - комплекс R- и C-субъединиц в цАМФ-связанной форме

RMSD – root mean square deviation/distance (среднеквадратичное отклонение/расстояние)

Rp-цАМФS – циклический аденозин-3`,5`-монофосфотиоат, Rp-изомер

Sp-цАМФS – циклический аденозин-3`,5`-монофосфотиоат, Sp-изомер

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Skalhegg, B. S.* Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA / B. S. Skalhegg, K. Tasken // Front. Biosci. 1997. V. 2. P. 331–342.

2. *Fimia, G. M.* Cyclic AMP signaling / G. M Fimia, P. Sassone-Corsi // J. Cell Sci. 2001. V. 114. P. 1971–1972.

3. *Johnson, D. A.* Dynamics of cAMP-dependent protein kinase / D. A. Johnson, P. Akamine, E. Radzio-Andzelm et al. // Chem. Rev. 2001. V. 101. P. 2243–2270.

4. *Kim, C.* W. PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation / C. Kim, C. Y. Cheng, A. S. Saldanha et al. // Cell. 2007. V. 130. P. 1032–1043.

5. *Badireddy, S.* Cyclic AMP analog blocks kinase activation by stabilizing inactive conformation: Conformational selection highlights a new concept in allosteric inhibitor design / S. Badireddy, G. Yunfeng, M. Ritchie et al. // Mol. Cell. Proteomics. 2011. V. 10. M110.004390.

6. *Su, Y.* Regulatory subunit of protein kinase A: structure of deletion mutant with cAMP binding domains / Y. Su, W. R. Dostmann, F. W. Herberg et al. // Science. 1995. V. 269, N 5225. P. 807–813.

7. *Dostmann, W. R. G.* (Rp)-cAMPS inhibits the cAMP-dependent protein kinase by blocking the cAMP-induced conformational transition / W. R. G. Dostmann // FEBS Lett. 1995. V.375. P. 231–234.

8. *Aandahl, E. M.* Protein kinase A type I antagonist restores immune responses of T cells from HIV-infected patients / E. M. Aandahl, P. Aukrust, B. S. Skalhegg et al. // FASEB J. 1998. V. 12. P. 855–862.

9. *Yang, W. L.* Novel function of the regulatory subunit of protein kinase A: regulation of cytochrome c oxidase activity and cytochrome c release / W. L. Yang, L. Iacono, W. M. Tang et al. // Biochemistry-US. 1998. V. 37, N 40. P. 14175–14180.

10. *Mavrakis, M.* mTOR kinase and the regulatory subunit of protein kinase A (PRKAR1A) spatially and functionally interact during autophagosome maturation / M. Mavrakis, J. Lippincott-Schwartz, C. A. Stratakis et al. // Autophagy. 2007. V. 3, N 2. P. 151–153.

11. *Chaturvedi, D.* Subcellular Localization and biological actions of activated RSK1 are determined by its interactions with subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase / D. Chaturvedi, H. M. Poppleton, T. Stringfield et al. // Mol. Cell. Biol. 2006. V. 26, N 12. P. 4586–4600.

12. *Zhang, L. A.* Transforming growth factor β-induced Smad3/Smad4 complex directly activates protein kinase A. / L. Zhang, C. J. Duan, C. Binkley et al. // Mol. Cell. Biol. 2004. V. 24, N 5. P. 2169–2180.

13. *Yang, W.-L.* Interaction of the regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase with PATZ1 (ZNF278) / W.-L. Yang, R. Ravatn, K. Kudoh et al. // Biochem. Bioph. Res. Co. 2010. V. 391,

N 3. P. 1318–1323.

14. *Gupte, R. S.* The second subunit of the replication factor C complex (RFC40) and the regulatory subunit (RIa) of protein kinase A form a protein complex promoting cell survival / R. S. Gupte, Y. Weng, L. Liu et al. // Cell Cycle. 2005. V. 4, N 2. P. 323–329.

15. *Passner, J. M.* Modeling the cAMP-induced allosteric transition using the crystal structure of CAP-cAMP at 2.1 A resolution / J. M. Passner, S. C. Schultz, T. A. Steitz // J. Mol. Biol. 2000. V. 304. P. 847–859.

16. *Joyce, M. G.* CprK crystal structures reveal mechanism for transcriptional control of halorespiration / M.G. Joyce, C. Levy, K. Gabor et al. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281, N 38. P. 28318–28325.

17. *Giardina, G.* NO sensing in Pseudomonas aeruginosa: structure of the transcriptional regulator DNR / G. Giardina, S. Rinaldo, K. A. Johnson et al. // J. Mol. Biol. 2008. V. 378. P. 1002–1015.

18. *Lanzilotta, W. N.* Structure of the CO sensing transcription activator CooA / W. N. Lanzilotta, D. J. Schuller, M. V. Thorsteinsson et al. // Nat. Struct. Biol. 2000. V. 7. P. 876–880.

19. *Zagotta, W. N.* Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels / W.N. Zagotta, N.B. Olivier, K.D. Black et al. // Nature. 2003. V. 425. P. 200–205.

20. *Flynn, G. E.* Structure and rearrangements in the carboxy-terminal region of SpIH channels / G. E. Flynn, K. D. Black, L. D. Islas et al. // Structure. 2007. V. 15, N 6. P. 671–682.

21. *Kaupp, U. B.* Cyclic nucleotide-gated ion channels / U. B. Kaupp, R. Seifert // Physiol Rev. 2002. V. 82. P. 769–824.

22. *Rehmann, H.* Structure of the cyclic-AMP-responsive exchange factor Epac2 in its auto-inhibited state / H. Rehmann, J. Das, P. Knipscheer et al. // Nature. 2006. V. 439. P. 625–628.

23. *Rehmann, H.* Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B / H. Rehmann, E. Arias-Palomo, M. A. Hadders et al. // Nature. 2008. V. 455. P. 124–127.

24. *Canaves, J. M.* Classification and phylogenetic analysis of the cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit family / J. M. Canaves, S. S. Taylor // J. Mol. Evol. 2002. V. 54, N 1. P. 17–29.

25. *Hofmann, F.* Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases / F. Hofmann, A. Ammendola, J. Schlossmann // J. Cell Sci. 2000. V. 113. P. 1671–1676.

26. *Osborne, B. W.* Crystal structure of cGMP-dependent protein kinase reveals novel site of interchain communication / B. W. Osborne, J. Wu, C. J. Mcfarland et al. // Structure. 2011. V. 19, N 9. P. 1317–1327.

27. *Wu, J.* Crystal structures of RIalpha subunit of cyclic adenosine 5'-monophosphate (cAMP)-dependent protein kinase complexed with (Rp)-adenosine 3',5'-cyclic monophosphothioate and (Sp)-adenosine 3',5'-cyclic monophosphothioate, the phosphothioate analogues of cAMP / J. Wu, J. M. Jones, X. Nguyen-Huu et al. // Biochemistry-US. 2004. V. 43, N 21. P. 6620–6629.

28. *Kim, C.* Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIalpha) subunits of PKA / C. Kim, N.-H. Xuong, S. S.Taylor // Science. 2005. V. 307, N 5710. P. 690–696.

29. *Boettcher, A. J.* Realizing the allosteric potential of the tetrameric protein kinase A RIα holoenzyme. / A. J. Boettcher, J. Wu, C. Kim et al. // Structure. 2011. V. 9. P. 265–276.

30. *Harper, S. M.* Structural dynamics in the activation of Epac / S. M. Harper, H. Wienk, R. W. Wechselberger et al. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283, N 10. P. 6501–6508.

31. *Akimotoa, M.* Signaling through dynamic linkers as revealed by PKA / M. Akimotoa, R. Selvaratnama, E. T. McNicholla et al. // P. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110, N 35. P. 14231–14236.

32. *Sjoberg, T. J.* Dissecting the cAMP-inducible allosteric switch in protein kinase A RIalpha / T. J. Sjoberg, A. P. Kornev, S. S.Taylor // Protein Sci. 2010. V. 19, N 6. P. 1213–1221.

33. *Rehmann, H.* Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2 / H. Rehmann, B. Prakash, E. Wolf et al. // Nat. Struct. Biol. 2003. V. 10, N 1. P. 26–32.

34. *Steinberg, R. A.* Arginine 210 is not a critical residue for the allosteric interactions mediated by binding of cyclic AMP to site A of regulatory (RIα) subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase / R. A. Steinberg, M. M. Symcox, S. Sollid et al.// J. Biol. Chem. 1996. V. 271, N 44. P. 27630–27636.

35. *Gibson, R. M.* Interaction of the regulatory and catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase. Electrostatic sites on the type I-alpha regulatory subunit / R. M. Gibson, Y. Ji-Buechler, S. S. Taylor // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 16343–16350.

36. *Gullingsrud, J.* Dynamic binding of PKA regulatory subunit RIalpha / J. Gullingsrud, C. Kim, S. S. Taylor et al. // Structure. 2006. V. 14. P. 141–149.

37. *Gong, B.* Exchange protein directly activated by cAMP plays a critical role in bacterial invasion during fatal rickettsioses / B. Gong, T. Shelite, F. C. Mei et al. // P. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110, N 48. P. 9615–19620.

38. *Walsh, D. A.* An adenosine 3′,5′-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle / D. A. Walsh, J. P. Perkins, E. G. Krebs // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. P. 3763–3765.

39. *Sanchez, C.* Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function / C. Sanchez, J. Diaz-Nido, J. Avila // Prog. Neurobiol. 2000. V. 61, N 2. P. 133–168.

40. *Dhalla, N. S.* Protein kinases as drug development targets for heart disease therapy / N. S. Dhalla, A. L. Muller// Pharmaceuticals. 2010. V. 3. P. 2111–2145.

41. *Proud, C. G.* Amino acid sequences at the two sites on glycogen synthetase phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase and their dephosphorylation by protein phosphatase-III / C. G. Proud, D. B. Rylatt, S. J. Yeaman et al. // FEBS Lett. 1977. V. 80, N 2. P. 435–442.

42. *Anand, G. S.* Cyclic-AMP and pseudosubstrate effects on type-I A-kinase regulatory and

catalytic subunit binding kinetics / G. S. Anand, S. S. Taylor, D. A. Johnson // Biochemistry-US. 2007. V. 46. P. 9283–9291.

43. *Kopperud, R.* Formation of inactive cAMP-saturated holoenzyme of cAMP-dependent protein kinase under physiological conditions / R. Kopperud, A. E. Christensen, E. Kjærland et al. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277, N 16. P. 13443–13448.

44. *Vigil, D.* A simple electrostatic switch important in the activation of type I protein kinase A by cyclic AMP / D. Vigil, J. H. Lin, C. A. Sotriffer et al. // Protein Sci. 2006. V. 15, N 1. P. 113–121.

45. *Kornev, A. P.* A generalized allosteric mechanism for cis-regulated cyclic nucleotide binding domains / A. P. Kornev, S. S. Taylor, L. F. Ten Eyck // PLoS Comput. Biol. 2008. V. 4, N 4. e1000056.

46. *Bruystens, J. G. H.* PKA RIα homodimer structure reveals an intermolecular interface with implications for cooperative cAMP binding and Carney complex disease / J. G. H Bruystens, J. Wu, A. Fortezzo et al. // Structure. 2014. V. 22, N 1. P. 59–69.

47. *Weldon, S. L.* Monoclonal antibodies as probes for functional domains in cAMP-dependent protein kinase II / S. L. Weldon, S. S. Taylor // J. Biol. Chem. 1995. V. 260, N 7. P. 4203–4209.

48. *Vigil, D.* Conformational differences among solution structures of the type Ialpha, IIalpha and IIbeta protein kinase A regulatory subunit homodimers: role of the linker regions / D. Vigil, D. K. Blumenthal, W. T. Heller et al. // J. Mol. Biol. 2004. V. 337, N 5. P. 1183–1194.

49. *Durgerian, S.* The consequences of Introducing an autophosphorylation site into the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase A / S. Durgerian, S. S. Taylor // J. Biol. Chem. 1989. V. 264, N 17. P. 9807–9813.

50. *Marchler-Bauer, A.* CDD: Conserved domains and protein three-dimensional structure / A. Marchler-Bauer, C. Zheng, F. Chitsaz et al. // Nucleic Acids Res. 2012. V. 41. P. D348–D352.

51. *Murzin, A.* G SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures / A. G. Murzin, S. E. Brenner, T. J. P. Hubbard et al. // J. Mol. Biol. 1995. V. 247. P. 536–540.

52. *Kannan, N.* Evolution of allostery in the cyclic nucleotide binding module / N. Kannan, J. Wu, J. Anand et al. // Genome Biol. 2007. V. 8, N 12. R264.

53. *McNicholl, E. T.* Communication between tandem cAMP binding domains in the regulatory subunit of protein kinase A-Ialpha as revealed by domain-silencing mutations / E. T. McNicholl, R. Das, S. SilDas et al. // J. Biol. Chem. 2010. V. 285, N 20. P. 15523–15537.

54. *Berman, H. M.* The cAMP binding domain: an ancient signaling module / H. M. Berman, L. F. Ten Eyck, D. S. Goodsell et al. // P. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102, N 1. P. 45–50.

55. *Bubis, J.* Correlation of photolabeling with occupancy of cAMP binding sites in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase I / J. Bubis, S. S. Taylor // Biochemistry-US. 1987. V.26. P. 3478–3486.

56. *Das, R.* Dynamically driven ligand selectivity in cyclic nucleotide binding domains / R. Das, S. Chowdhury, M. T. Mazhab-Jafari et al. // J. Biol. Chem. 2009. V. 284, N 35. P. 23682–23696.

57. *Taylor, S. S.* Dynamics of signaling by PKA / S. S. Taylor, C. Kim, D. Vigil et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2005. V. 1754, N 1–2. P. 25–37.

58. *Abu-Abed, M.* Definition of an electrostatic relay switch critical for the cAMP-dependent activation of protein kinase A as revealed by the D170A mutant of RIalpha / M. Abu-Abed, R. Das, L. Wang et al. // Proteins. 2007. V. 69. P. 112–124.

59. *Kim, S.* 6-Benzylaminopurine stimulates melanogenesis via cAMP-independent activation of protein kinase A / S. Kim, J. Lee, E. Jung et al. // Arch. Dermatol. Res. 2009. V. 301, N 3. P. 253–258.

60. *Corbin, J. D.* Studies of cGMP analog specificity and function of the two intrasubunit binding sites of cGMP-dependent protein kinase / J. D. Corbin, D. Ogreid, J. P. Miller et al. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261, N 3. P. 1208–1214.

61. *Ogreid, D.* Comparison of the two classes of binding sites (A and B) of type II cyclic-AMP-dependent protein kinases by using cyclic nucleotide analogs / D. Ogreid, R. Ekanger, R. H. Suva et al. // Eur. J. Biochem. 1989. V. 181. P. 19–31.

62. *Ogreid, D.* Activation of protein kinase isozymes by cyclic nucleotide analogs used singly or in combination. Principles for optimizing the isozyme specificity of analog combinations / D. Ogreid, R. Ekanger, R. H. Suva et al. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 150, N 1. P. 219–227.

63. *Saldanha, S. A.* Assay principle for modulators of protein-protein interactions and its application to non-ATP-competitive ligands targeting protein kinase A / S. A. Saldanha, G. Kaler, H. B. Cottam et al.// Anal. Chem. 2006. V. 78, N 24. P. 8265–8272.

64. *Dostmann, W. R. G.* Identifying the molecular switches that determine whether (Rp)-cAMPS functions as an antagonist or an agonist in the activation of cAMP-dependent protein kinase I / W. R. G. Dostmann, S. S. Taylor // Biochemistry-US. 1991. V. 30. P. 8710–8716.

65. *Anand, G. S.* Cyclic AMP- and (*R*p)-cAMPS-induced conformational changes in a complex of the catalytic and regulatory (RIα) subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase / G. S. Anand, S. Krishnamurthy, T. Bishnoi et al. // Mol. Cell. Proteomics. 2010. V 9, N 10. P. 2225–2237.

66. *Rehmann, H.* Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor EPAC / H. Rehmann, F. Schwede, S. O. Doskeland et al. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278, N 40. P. 38548–38556.

67. *Huang, L. J.-s.* Dissecting cAMP binding domain A in the RIa subunit of cAMP-dependent protein kinase / L. J.-s. Huang, S. S. Taylor // J. Biol. Chem. 1998. V. 273, N 41. P. 26739–26746.

68. *Ringheim, G. E.* Dissecting the domain structure of the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase I and elucidating the role of MgATP / G. E. Ringheim, S. S. Taylor // J. Biol. Chem. 1990. V. 265, N 9. P. 4800–4808.

69. *Herberg, F. W.* Active site mutations define the pathway for the cooperative activation of cAMP-dependent protein kinase / F. W. Herberg, S. S. Taylor, W. R. G. Dostmann // Biochemistry-US. 1996. V. 35. P. 2934–2942.

70. *Cheng, C. Y.* Sensing domain dynamics in PKA-Ialpha complexes by solution X-Ray scattering / C. Y. Cheng, J. Yang, S. S. Taylor et al. // J. Biol. Chem. 2009. V. 284, N 51.P. 35916–35925.

71. *Zhang, P.* Structure and allostery of the PKA RIIβ tetrameric holoenzyme / P. Zhang, E. V. Smith-Nguyen, M. M. Keshwani1 et al. // Science. 2012. V. 335, N 6069. P. 712–716.

72. *Dao, K. K.* Epac1 and cAMP-dependent protein kinase holoenzyme have similar cAMP affinity, but their cAMP domains have distinct structural features and cyclic nucleotide recognition / K. K. Dao, K. Teigen, R. Kopperud et al. // J. Biol. Chem. 2006.- V. 281, N 30. P. 21500–21511.

73. *Moll, D.* Comparative thermodynamic analysis of cyclic nucleotide binding to protein kinase A / D. Moll, S. Schweinsberg, C. Hammann et al. // Biol. Chem. 2007. V. 388. P. 163–172.

74. *Ringheim, G. E.* Effects of cAMP-binding site mutations on intradomain cross-communication in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase I / G. E. Ringheim, S. S. Taylor // J Biol. Chem. 1990. V. 265, N 32. P. 19472–19478.

75. *Yang, J.* Allosteric network of cAMP-dependent protein kinase revealed by mutation of Tyr204 in the PC1 Loop / J. Yang, S. M. Garrod, M. S. Deal et al. // J. Mol. Biol. 2005. V. 346. P. 191–201.

76. *Gibson, R. M.* Dissecting the cooperative reassociation of the regulatory and catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase. Role of Trp-196 in the catalytic subunit / R. M. Gibson, S. S. Taylor // J. Biol. Chem. 1997. V. 272, N 51. P. 31998–32005.

77. *Heller, W. T.* C Subunits binding to the protein kinase A RIα dimer induce a large conformational change / W. T. Heller, D. Vigil, S. Brown et al. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279, N 18. P. 19084–19090.

78. *Vigil, D.* Differential effects of substrate on type I and type II PKA holoenzyme dissociation / D. Vigil, D. K. Blumenthal, S. Brown et al. // Biochemistry-US. 2004. V. 43. P. 5629–5636.

79. *Herberg, F. W.* Crosstalk between domains in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase: influence of amino terminus on cAMP binding and holoenzyme formation / F. W. Herberg, W. R. G. Dostmann, M. Zorn et al. // Biochemistry-US. 1994. V. 33. P. 7485–7494.

80. Quantum 3.3.0. Moscow: Quantum Pharmaceuticals, 2007.

81. *Frisch, M. J.* Gaussian 03, Revision B.05. / M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel et al. Pittsburgh PA: Gaussian Inc., 2003.

82. *Roothan, C. C. J.* New developments in molecular orbital theory / C. C. J. Roothan // Rev. Mod. Phys. 1951. V. 23. P. 69–83.

83. *Hehre, W. J.* Self-consistent molecular orbital methods. XII. Further extensions of gaussian-type basis sets for use in molecular orbital studies of organic molecules / W. J. Hehre, R. Ditchfield,

J. A. Pople // J. Chem. Phys. 1972. V. 56. P. 2257–2261.

84. *Francl, M. M.* Self-consistent molecular orbital methods. XXIII. A polarization-type basis set for second-row element / M. M. Francl, W. J. Petro, W. J. Hehre et al. // J. Chem. Phys. 1982. V. 77. P. 3654–3665.

85. *Hariharan, P. C.* The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies / P. C. Hariharan, J. A. Pople // Theor. Chim. Acta. 1973. V. 28. P. 213–222.

86. *Clark, T.* Efficient diffuse function-augmented basis sets for anion calculations. III. The 3-21+G set for first-row elements, Li-F / T. Clark, J. Chandrasechar, G. W. Spitznagel et al. // J. Comput. Chem. 1983. V. 4. P. 294–301.

87. *Phillips, J. C.* Scalable molecular dynamic with NAMD / J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang et al. // J. Comput. Chem. 2005. V. 26. P. 1781–1802.

88. *Jorgensen, W. L.* Comparison of simple potential functions for simulating liquid water / W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura et al. // J. Chem. Phys. 1983. V.79. P. 926–935.

89. *MacKerell, A. D. Jr.* All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins / A. D. MacKerell Jr., D. Bashford, M. Bellott et al. // J. Phys. Chem. B. 1998. V.102. P. 3586–3616.

90. *MacKerell, A. D. Jr.* All-atom empirical force field for nucleic acids: 2) Application to molecular dynamics simulations of DNA and RNA in solution / A. D. MacKerell Jr., N. Banavali, // J. Comput. Chem. 2000. V. 21. P. 105–120.

91. *Essmann, U.* A smooth particle mesh Ewald method / U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz et al. // J. Chem. Phys. 1995. V. 103. P. 8577–8593.

92. *Keller, B.* Comparing geometric and kinetic cluster algorithms for molecular simulation data / B. Keller, X. Daura, W. F. van Gunsteren // J. Chem. Phys. 2010. V. 132, N 7. 074110.

93. *Noe, F.* Hierarchical analysis of conformational dynamics in biomolecules: transition networks of metastable states / F. Noe, I. Horenko, C. Schutte et al. // J. Chem. Phys. 2007. V. 126, N 15. 155102.

94. *Fraccalvieri, D.* Conformational and functional analysis of molecular dynamics trajectories by self-organising maps / D. Fraccalvieri, A. Pandini, F. Stella et al. // BMC Bioinformatics. 2011. V. 12, N 1. 158.

95. Statistica, version 10. Tulsa: StatSoft Inc., 2011.

96. *Loohach, R.* Effect of distance functions on K-means clustering algorithm / R. Loohach, K. Garg // Int. J. Comput. Appl. 2012. V. 49, N 6. P. 7–9.

97. *de Groot, B. L.* Essential dynamics of reversible peptide folding: Memory-free conformational dynamics governed by internal hydrogen bonds / B. L. de Groot, X. Daura, A. E. Mark et al. // J. Mol. Biol. 2001. V. 309. P. 299–313.

98. SPSS for Windows, Rel. 20.0.0. Chicago: SPSS Inc., 2011.

99. *Wang, Y.* Implementation of accelerated molecular dynamics in NAMD / Y. Wang, C. B. Harrison, K. Schulten et al. // Comput. Sci Disc. 2011. V. 4. 015002.

100. *Hammelberg, D.* Accelerated molecular dynamics: a promising end efficient simulation methodfor biomolecules / D. Hammelberg, J. Mongan, J. A. McCammon // J. Chem. Phys. 2004. V. 120, N 24. P. 11919–11929.

101. *Bhandarkar, M.* NAMD user's guide version 2.8b1 / M. Bhandarkar, A. Bhatele, E. Bohm et al. Urbana: University of Illinois, 2011.

102. NAMD: mailing list / J. Wereszczynski, 2012.
Режим доступа: http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/mailing_list/namd-l.2011-2012/3849.html

103. *Humphrey, W.* VMD – visual molecular dynamics / W. Humphrey, A. Dalke, K. J. Schulten // J. Mol. Graphics. 1996. V. 14, N 1. P. 33–38.

104. *Koradi, R.* Molmol 2K.1 / R. Koradi. Zurich: ETH, 2003.

105. *Das, R.* A Model for agonism and antagonism in an ancient and ubiquitous cAMP-binding domain / R. Das, G. Melacini // J. Biol. Chem. 2007. V. 282, N 1. P. 581–593.

106. *Wu, J.* RIa Subunit of PKA: A cAMP-free structure reveals a hydrophobic capping mechanism for docking cAMP into site B / J. Wu, S. Brown, N.-H. Xuong et al. // Structure (Camb). 2004. V. 12, N 6. P. 1057–1065.

107. *Steinberg, R. A.* Mutations that alter the charge of type I regulatory subunit and modify activation properties of cyclic AMP-dependent protein kinase from S49 mouse lymphoma cells / R. A. Steinberg, K. B. Gorman, D. Ogreid et al. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266, N 6. P. 3547–3553.

108. *Baker, N. A.* Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and to the ribosomes // N. A. Baker, D. Sept, J. S. Holst et al. / P. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98, N 18. P. 10037–10041.

109. *Wu, J.* PKA type IIα holoenzyme reveals a combinatorial strategy for isoform diversity / J. Wu, S. H. J. Brown, S. von Daake et al.// Science. 2007. V. 318, N 5848. P. 274–279.

110. *E, W.* Modeling rare transition events: lecture / W. E, E. Vanden-Eijnden . N.Y.: Courant Inst. of Math. Sci., 2013. Режим доступа: http://www.cims.nyu.edu/~donev/Teaching/CoarseGraining-Fall2013/Lectures/TransitionTheory_Review.pdf

111. *Zhao, R.* Maximum flux transition paths of conformational change / R. Zhao, J. Shen, R. D. Skeel // J. Chem. Theory Comput. 2010. V. 6, N 8. P. 2411–2423.

112. *Maragliano, L.* String method in collective variables: minimum free energy paths and isocommittor surfaces / L. Maragliano, A. Fischer, E. V. Eijnden et al. // J. Chem. Phys. 2006. V. 125. 024106.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор искренне благодарит своего научного руководителя Василия Евгеньевича Стефанова за предоставленную тему и поддержку на протяжении всех этапов исследования, профессора Елену Владимировну Савватееву-Попову и старшего научного сотрудника Бориса Федоровича Щеголева за интерес и внимание к работе, а также конструктивные замечания при ее обсуждении.

Автор особенно признателен старшему научному сотруднику Елене Андреевне Вершининой за консультации и помощь в математической обработке результатов, приведенных в пятой и шестой главах и профессору Олегу Евгеньевичу Квятковскому за помощь в проведении расчетов с использованием программного пакета Gaussian. Автор благодарен сотруднику ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет» Андрею Александровичу Мамонову за участие в обсуждении результатов.

Автор глубоко признателен своему первому научному руководителю покойному Андрею Владимировичу Попову, под руководством которого были начаты исследования.

Искренняя благодарность руководству и всему коллективу лабораторий сравнительной физиологии сенсорных систем (ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН»), нейрогенетики (ФГБУН «Институт Физиологии им. И. П. Павлова РАН») и кафедры биохимии (ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет»).

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Данные, приведенные в работах [65] и [42] являются уникальными и представляющими большую ценность, так как только эта группа исследователей предприняла попытку установить значения констант диссоциации R_AC комплекса в присутствии лигандов. Однако при более подробном знакомстве с данными возникает вопрос: что на самом деле измеряли авторы работы. И ответ на этот вопрос представляется не менее важным, чем сами данные.

В основе эксперимента лежало использование флуоресцентно меченой R-субъединицы и эффект гашения флуоресценции при связывании с C-субъединицей. Константа диссоциации определялась как отношение констант скорости диссоциации и ассоциации субъединиц.

Что касается методики измерения константы скорости ассоциации субъединиц, то она не бесспорна, однако по факту, видимо, дала правдоподобный результат ($1{,}9\cdot10^7$ $M^{-1}c^{-1}$). Одновременно смешивались R-субъединицы (100 нМ), C-субъединицы (1-6 μМ) и лиганд (10 μМ для цАМФ и 100 μМ для Rp-цАМФS и Sp-цАМФS). Снижение флуоресценции наблюдалось в течение 0,2 с. Очевидно, что в системе одновременно протекают две параллельные реакции: связывание свободной R-субъединицы с лигандом и связывание свободной R-субъединицы с C-субъединицей. Исходя из экспериментально измеренных констант скоростей этих реакций ($2{,}0\cdot10^7$ $M^{-1}c^{-1}$ и $1{,}15\cdot10^6$ $M^{-1}c^{-1}$ для ассоциации R-субъединицы с C-субъединицей и цАМФ соответственно), скорости обеих реакций примерно равны. Поэтому на первом этапе наблюдения с C-субъединицей ассоциирует свободная R-субъединица и лишь на втором этапе в процесс образования RC комплекса включается лигандсвязанная R-субъединица. Однако авторы не наблюдали двухстадийной кинетики связывания, поэтому их вывод о независимости константы скорости ассоциации от присутствия лиганда звучит вполне убедительно. Более того, сложно предположить, что константа ассоциации в присутствии лиганда будет больше, чем в его отсутствие. Поэтому даже если допустить возможность ошибки со стороны авторов, то ошибка эта может состоять только в завышении константы скорости ассоциации субъединиц в присутствии лиганда, а следовательно, в занижении равновесной константы диссоциации соответствующего RC комплекса.

С методикой измерения константы скорости диссоциации R- и C-субъединиц ситуация обстоит несколько сложнее. С одной стороны, эта методика более прозрачная и понятная, не допускающая протекания параллельных реакций. С другой стороны, обработка экспериментальных результатов представляется нам не совсем корректной. Вкратце, RC-комплекс (100 нМ) смешивался с избытком немеченой R-субъединицы и лигандами (10 μМ для цАМФ и 100 μМ для Rp-цАМФS и Sp-цАМФS). Наблюдался рост флуоресценции, который авторы описывают в виде одноэкспоненциальной кинетики. Собственно использование

одноэкспоненциальной кинетики и вызывает вопрос в этой методике. И чтобы оценить границы ее применимости, мы решили построить модель, протекающих в системе процессов.

Для начала рассмотрим одностадийный процесс диссоциации RC комплекса в отсутствие лигандов:

$$[RC] \underset{k_-}{\longleftarrow\!\!\!\!\!\!\longrightarrow^{k_+}} [R]+[C]$$

При этом отметим, что, вследствие избытка немеченых субъединиц, ассоциацию субъединиц мы не наблюдаем, и скоростью этого процесса можно пренебречь.

Запишем и решим уравнение скорости диссоциации RC комплекса:

$$\frac{d[RC]}{dt} = -k_+[RC]$$

$$\frac{d[RC]}{[RC]} = -k_+ dt$$

$$\ln[RC] = -k_+ t + const$$

Пусть начальная концентрация RC комплекса равна $[RC]_0$, тогда:

$$[RC] = [RC]_0 e^{-k_+ t}.$$

По закону сохранения масс выполняется равенство:

$$[RC]+[R] = [RC]_0.$$

Тогда:

$$[R] = [RC]_0 - [RC]_0 e^{-k_+ t} \qquad \text{(A.1)}$$

Именно эта одноэкспоненциальная модель и использовалась авторами работы при определении константы скорости диссоциации RC комплекса как в отсутствие, так и в присутствии лигандов.

Рассмотрим процессы, протекающие в присутствии цАМФ. Многочисленные экспериментальные данные [42, 43] показывают, что процесс в этом случае становится двухстадийным:

$$[RC]+[cAMP] \underset{k_{-1}}{\longleftarrow\!\!\!\!\!\!\longrightarrow^{k_{+1}}} [RCcAMP] \underset{k_{-2}}{\longleftarrow\!\!\!\!\!\!\longrightarrow^{k_{+2}}} [RcAMP]+[C].$$

Как и в случае диссоциации RC комплекса в отсутствие лигандов ассоциацией R и C субъединиц, определяемой константой скорости k_{-2}, можно пренебречь. Тогда имеем систему из трех уравнений, описывающую все значимые процессы.

$$\begin{cases} \dfrac{d[RC]}{dt} = -k_{+1}[RC]\cdot[cAMP] + k_{-1}[RCcAMP] \\ \dfrac{d[RCcAMP]}{dt} = k_{+1}[RC]\cdot[cAMP] - (k_{-1}+k_{+2})\cdot[RCcAMP] \\ \dfrac{d[RcAMP]}{dt} = k_{+2}[RCcAMP] \end{cases} \qquad \text{(A.2)}$$

Концентрация цАМФ, используемая в эксперименте, довольно большая. Поэтому можно ее принять за константу и вследствие этого ввести приближение $k'_{+1} = k_{+1} \cdot [cAMP]$. Тогда система (А.2) преобразуется в систему (А.3).

$$\begin{cases} \dfrac{d[RC]}{dt} = -k'_{+1}[RC] + k_{-1}[RCcAMP] \\ \dfrac{d[RCcAMP]}{dt} = k'_{+1}[RC] - (k_{-1} + k_{+2}) \cdot [RCcAMP] \\ \dfrac{d[RcAMP]}{dt} = k_{+2}[RCcAMP] \end{cases} \qquad \text{(А.3)}$$

Введем обозначения [RC] = x, [RCcAMP] = y, [RcAMP] = z и решим систему уравнений:

$$\begin{cases} \dfrac{dx}{dt} = -k'_{+1}x + k_{-1}y \\ \dfrac{dy}{dt} = k'_{+1}x - (k_{-1} + k_{+2}) \cdot y \\ \dfrac{dz}{dt} = k_{+2}y \end{cases} \qquad \text{(А.4)}$$

Из второго уравнения системы получим соотношения (А.5) и (А.6):

$$-\left(\frac{dy}{dt} + k_{+2}y\right) = k_{-1}y - k'_{+1}x \qquad \text{(А.5)}$$

$$x = \frac{1}{k'_{+1}}\frac{dy}{dt} + \frac{(k_{-1} + k_{+2})}{k'_{+1}} \cdot y \qquad \text{(А.6)}$$

Продифференцируем выражение (А.6):

$$\frac{dx}{dt} = \frac{1}{k'_{+1}}\frac{d^2y}{dt^2} + \frac{(k_{-1} + k_{+2})}{k'_{+1}} \cdot \frac{dy}{dt} \qquad \text{(А.7)}$$

и подставим выражения (А.5) и (А.7) в первое уравнение системы (А.4):

$$\frac{1}{k'_{+1}}\frac{d^2y}{dt^2} + \frac{(k_{-1} + k_{+2})}{k'_{+1}} \cdot \frac{dy}{dt} = -\frac{dy}{dt} - k_{+2}y \qquad \text{(А.8)}$$

Упростим уравнение (А.8):

$$\frac{1}{k'_{+1}}\frac{d^2y}{dt^2} + \frac{(k_{-1} + k_{+2} + k'_{+1})}{k'_{+1}} \cdot \frac{dy}{dt} + k_{+2}y = 0$$

$$\frac{d^2y}{dt^2} + (k_{-1} + k_{+2} + k'_{+1}) \cdot \frac{dy}{dt} + k'_{+1} \cdot k_{+2}y = 0 \qquad \text{(А.9)}$$

Решим квадратное уравнение (А.9):

$\lambda^2 + (k_{-1} + k_{+2} + k'_{+1}) \cdot \lambda + k'_{+1} \cdot k_{+2} = 0$ – характеристическое уравнение

$D = b^2 - 4ac$

$D = (k_{-1} + k_{+2} + k'_{+1})^2 - 4 \cdot k'_{+1} \cdot k_{+2} = (k_{-1} - k_{+2} + k'_{+1})^2 + 4 \cdot k_{+2} \cdot k_{-1}$

Из первого выражения для дискриминанта следует, что

$$\sqrt{D} < k_{-1} + k_{+2} + k'_{+1} \qquad \text{(A.10)}$$

Из второго выражения следует то, что дискриминант всегда положителен, а следовательно, корень из него является вещественным числом.

Характеристическое уравнение имеет два корня:

$$\lambda_{1,2} = \frac{-b \pm \sqrt{D}}{2a} = \frac{-(k_{-1} + k_{+2} + k'_{+1}) \pm \sqrt{(k_{-1} + k_{+2} + k'_{+1})^2 - 4 \cdot k'_{+1} \cdot k_{+2}}}{2} \qquad \text{(A.11)},$$

причем, исходя из выражения (A.10) оба корня положительны.

В результате решением уравнения (A.9) является функция

$$y(t) = C_1 e^{\lambda_1 t} + C_2 e^{\lambda_2 t} \qquad \text{(A.12)}$$

$y = [RCcAMP]$. Поэтому $y(0) = [RCcAMP]_0 = 0$, следовательно $C_1 = -C_2$.

Таким образом, выражение (A.12) преобразуется в (A.13)

$$y(t) = C_1 e^{\lambda_1 t} - C_1 e^{\lambda_2 t} \qquad \text{(A.13)}.$$

Найдем $\frac{dy}{dt}$:

$$\frac{dy}{dt} = C_1 \lambda_1 e^{\lambda_1 t} - C_1 \lambda_2 e^{\lambda_2 t} \qquad \text{(A.14)}$$

и подставим выражения (A.14) и (A.13) в выражение (A.6):

$$x(t) = \frac{1}{k'_{+1}} \left(C_1 \lambda_1 e^{\lambda_1 t} - C_1 \lambda_2 e^{\lambda_2 t} \right) + \frac{(k_{-1} + k_{+2})}{k'_{+1}} \cdot \left(C_1 e^{\lambda_1 t} - C_1 e^{\lambda_2 t} \right)$$

Определим значение коэффициента C_1 на основании того, что $x = [RC]$ и $x(0) = [RC]_0$.

$$x(0) = \frac{1}{k'_{+1}} (C_1 \lambda_1 - C_1 \lambda_2) + \frac{(k_{-1} + k_{+2})}{k'_{+1}} \cdot (C_1 - C_1) = \frac{C_1}{k'_{+1}} (\lambda_1 - \lambda_2) = \frac{C_1}{k'_{+1}} \cdot \sqrt{(k_{-1} + k_{+2} + k'_{+1})^2 - 4 \cdot k'_{+1} \cdot k_{+2}}$$

$$[RC]_0 = \frac{C_1}{k'_{+1}} \cdot \sqrt{(k_{-1} + k_{+2} + k'_{+1})^2 - 4 \cdot k'_{+1} \cdot k_{+2}}$$

$$C_1 = \frac{[RC]_0 \cdot k'_{+1}}{\sqrt{(k_{-1} + k_{+2} + k'_{+1})^2 - 4 \cdot k'_{+1} \cdot k_{+2}}}$$

Таким образом, окончательные выражения для y(t) и x(t):

$$y(t) = \frac{[RC]_0 \cdot k'_{+1}}{\sqrt{(k_{-1} + k_{+2} + k'_{+1})^2 - 4 \cdot k'_{+1} \cdot k_{+2}}} (e^{\lambda_1 t} - e^{\lambda_2 t}) \qquad \text{(A.15)}$$

$$x(t) = \frac{[RC]_0}{\sqrt{(k_{-1} + k_{+2} + k'_{+1})^2 - 4 \cdot k'_{+1} \cdot k_{+2}}} \left\{ (\lambda_1 + k_{-1} + k_{+2}) \cdot e^{\lambda_1 t} - (\lambda_2 + k_{-1} + k_{+2}) \cdot e^{\lambda_2 t} \right\} \qquad \text{(A.16)}$$

По закону сохранения масс для z(t) справедливо выражение:

$$z(t) = [RC]_0 - x(t) - y(t) \qquad \text{(A.17)}$$

Подставим в выражение (A.17) выражения (A.15) и (A.16). Тогда:

$$z(t)=[RC]_0-\frac{[RC]_0}{\sqrt{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})^2-4\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}}\left\{(\lambda_1+k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})\cdot e^{\lambda_1 t}-(\lambda_2+k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})\cdot e^{\lambda_2 t}\right\} \quad \text{(A.18)}$$

Упростим выражение (A.18):

$$\lambda_1+k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}=\frac{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})+\sqrt{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})^2-4\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}}{2}=-\lambda_2\equiv a_2$$

$$\lambda_2+k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}=\frac{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})-\sqrt{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})^2-4\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}}{2}=-\lambda_1\equiv a_1$$

$$z(t)=[RcAMP](t)=[RC]_0-\frac{[RC]_0}{\sqrt{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})^2-4\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}}\left\{a_2\cdot e^{-a_1 t}-a_1\cdot e^{-a_2 t}\right\}$$

$$[RcAMP]=[RC]_0-\frac{[RC]_0}{\sqrt{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})^2-4\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}}\cdot a_2\cdot e^{-a_1 t}+\frac{[RC]_0}{\sqrt{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})^2-4\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}}\cdot a_1\cdot e^{-a_2 t}$$

$$[RcAMP]=[RC]_0-[RC]_0\left(\frac{k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}}{2\cdot\sqrt{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})^2-4\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}}+\frac{1}{2}\right)\cdot e^{-a_1 t}+$$

$$+[RC]_0\left(\frac{k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}}{2\cdot\sqrt{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})^2-4\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}}-\frac{1}{2}\right)\cdot e^{-a_2 t} \quad \text{(A.19)}$$

Разложим в ряд выражение $\sqrt{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})^2-4\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}$ и оставим два первых члена ряда.

$$\sqrt{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})^2-4\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}=(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})\cdot\sqrt{1-\frac{4\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})^2}}=$$

$$=(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})\cdot\left\{1-\frac{1}{2}\cdot\frac{4\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})^2}-\frac{1}{2}\cdot\frac{1}{4}\cdot\left(\frac{4\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})^2}\right)^2-\frac{1}{2}\cdot\frac{1}{4}\cdot\frac{3}{6}\cdot\left(\frac{4\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})^2}\right)^3\cdots\right\}\approx$$

$$\approx(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})-\frac{2\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}{k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}} \quad \text{(A.20)}$$

Тогда:

$$1)\ a_1=\frac{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})-\sqrt{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})^2-4\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}}{2}\approx$$

$$\approx\frac{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})-(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})+\frac{2\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}{k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}}}{2}=\frac{k'_{+1}\cdot k_{+2}}{k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}} \quad \text{(A.21)}$$

$$2)\ \frac{k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}}{2\cdot\sqrt{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})^2-4\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}}+\frac{1}{2}\approx\frac{k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}}{2\cdot\left((k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})-\frac{2\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}{k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}}\right)}+\frac{1}{2}=$$

$$= \frac{\left(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}\right)-\dfrac{2\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}{k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}}}{2\cdot\left(\left(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}\right)-\dfrac{2\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}{k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}}\right)}+\frac{\dfrac{2\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}{k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}}}{2\cdot\left(\left(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}\right)-\dfrac{2\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}{k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}}\right)}+\frac{1}{2}=$$

$$=1+\frac{k'_{+1}\cdot k_{+2}}{\left(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}\right)^2-2\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}} \qquad \text{(A.22)}$$

$$3)\ \frac{k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}}{2\cdot\sqrt{\left(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}\right)^2-4\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}}+\frac{1}{2}\approx\frac{k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}}{2\cdot\left(\left(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}\right)-\dfrac{2\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}{k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}}\right)}-\frac{1}{2}=$$

$$=\frac{k'_{+1}\cdot k_{+2}}{\left(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}\right)^2-2\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}} \qquad \text{(A.23)}$$

Оценим выражение $\dfrac{k'_{+1}\cdot k_{+2}}{\left(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}\right)^2-2\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}$.

$$\frac{k'_{+1}\cdot k_{+2}}{\left(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}\right)^2-2\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}=\frac{k'_{+1}\cdot k_{+2}}{k_{-1}^2+k_{+2}^2+\left(k'_{+1}\right)^2+2\cdot k'_{+1}\cdot k_{-1}+2\cdot k_{+2}\cdot k_{-1}}=$$

$$=\frac{1}{\dfrac{k_{-1}^2}{k'_{+1}\cdot k_{+2}}+\dfrac{k_{+2}}{k'_{+1}}+\dfrac{k'_{+1}}{k_{+2}}+\dfrac{2\cdot k_{-1}}{k_{+2}}+\dfrac{2\cdot k_{-1}}{k'_{+1}}}=\frac{1}{\left(\dfrac{k_{+2}}{k'_{+1}}+\dfrac{k'_{+1}}{k_{+2}}\right)+\dfrac{k_{-1}}{k'_{+1}}\cdot\left(\dfrac{k_{-1}+2\cdot k'_{+1}}{k_{+2}}+2\right)}=$$

$$=\frac{1}{\left(\dfrac{k_{+2}}{k'_{+1}}+\dfrac{k'_{+1}}{k_{+2}}\right)+Kd'_1\cdot\left(\dfrac{k_{-1}+2\cdot k'_{+1}}{k_{+2}}+2\right)}.$$

Согласно экспериментальным данным $Kd_1>1{,}5\cdot10^{-6}M$ (раздел 1.6.1, таблица 1.1), следовательно, $Kd'_1>0{,}15$[31].

Кроме того:

а) $\dfrac{k_{+2}}{k'_{+1}}+\dfrac{k'_{+1}}{k_{+2}}\geq 2$ (как сумма двух положительных взаимно обратных чисел)

б) $\dfrac{k_{-1}+2\cdot k'_{+1}}{k_{+2}}>0$[32].

Исходя из этого:

$$\frac{k'_{+1}\cdot k_{+2}}{\left(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}\right)^2-2\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}=\frac{1}{\left(\dfrac{k_{+2}}{k'_{+1}}+\dfrac{k'_{+1}}{k_{+2}}\right)+Kd'_1\cdot\left(\dfrac{k_{-1}+2\cdot k'_{+1}}{k_{+2}}+2\right)}<\frac{1}{2+0{,}15\cdot(0+2)}=0{,}43.$$

---

[31] Согласно нашим данным значение Kd_1 больше приведенного, по крайней мере, на порядок, а следовательно, рассматриваемое приближение работает еще лучше.

[32] Максимальное значение этого выражения будет достигнуто при условии соблюдения квазиравновесного приближения: $k_{+2}<<k'_{+1}$, или $k_{+2}<<k_{-1}$, или $k_{+2}<10\cdot\left(k'_{+1}+k_{-1}\right)$.

Такая оценка значения коэффициента $\frac{k'_{+1}\cdot k_{+2}}{(k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1})^2-2\cdot k'_{+1}\cdot k_{+2}}$ позволяет в первом приближении допустить его равным нулю. И поэтому уравнение (А.19) трансформируется в уравнение (А.24):

$$[RcAMP]\approx[RC]_0-[RC]_0\cdot e^{-a_1 t} \qquad \text{(А.24)},$$

где коэффициент a_1, в соответствии с (А.21), приближенно равен $\frac{k'_{+1}\cdot k_{+2}}{k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}}$.

Таким образом, действительно одноэкспоненциальная модель, используемая авторами работы, годится для определения константы скорости диссоциации RC комплекса как в отсутствие, так и в присутствии цАМФ. Однако в показателе экспоненты находится не константа скорости одной из протекающих реакций, а коэффициент a_1. Найдем его связь с константой скорости k_{+2}.

$$a_1\approx\frac{k'_{+1}\cdot k_{+2}}{k_{-1}+k_{+2}+k'_{+1}}=k_{+2}\cdot\frac{k'_{+1}}{1+\frac{k_{-1}}{k'_{+1}}+\frac{k_{+2}}{k'_{+1}}}=k_{+2}\cdot\frac{1}{1+Kd'_1+\frac{k_{+2}}{k'_{+1}}}<k_{+2} \qquad \text{(А.25)}$$

То есть, коэффициент a_1 в показателе экспоненты всегда меньше константы k_{+2}. Обобщив все приведенные рассуждения, можно сделать вывод, что полученное в рассматриваемых экспериментальных работах значение константы скорости диссоциации RC комплекса в присутствии лиганда (a_1) можно рассматривать в качестве грубого (заниженного) приближения значения константы k_{+2}. Учет экспериментально полученных значений констант a_1, Kd_4, Kd_3 и k_{-2} в принципе позволяет найти точное значение константы k_{+2}. Однако ввиду большого разброса этих экспериментальных данных, мы решили не вводить уточняющую поправку и использовать в качестве грубого приближения значения k_{+2} среднее значение между всеми полученными в экспериментах значениями a_1 (раздел 1.6.1).

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

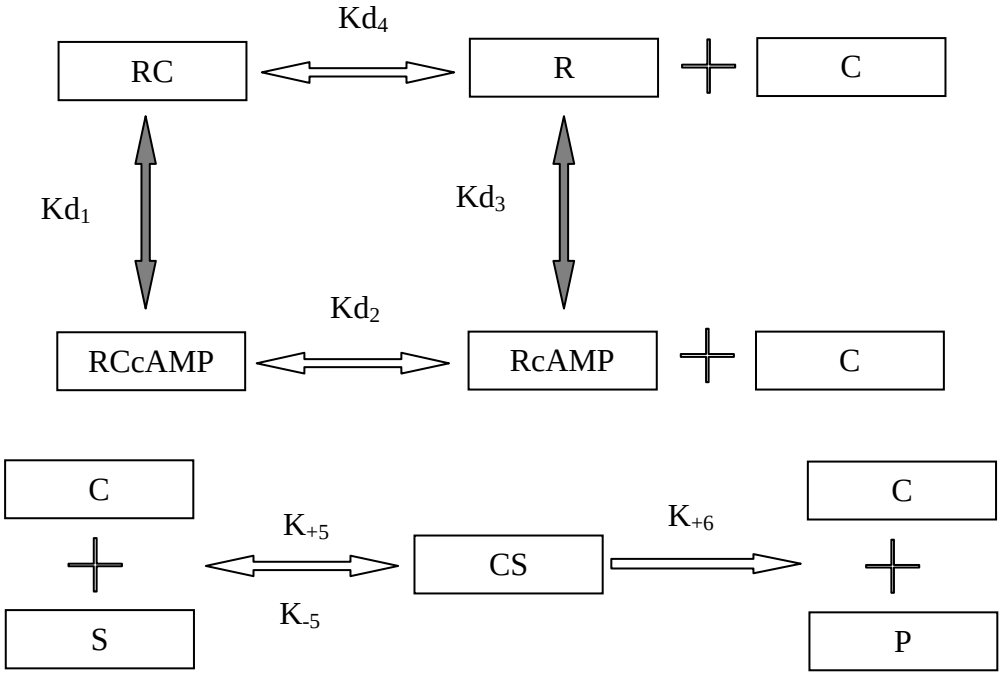
Б.1 R_AC комплекс

Б.1.1. Схема процессов и постановка задачи

Из приведенной на рисунке Б.1 схемы вытекает важное соотношение между равновесными константами Kd_1, Kd_2, Kd_3 и Kd_4, базирующееся на принципе независимости изменения свободной энергии реакции от ее пути.

$$Kd_3 \cdot Kd_2 = Kd_1 \cdot Kd_4 \qquad (Б.1)$$

Используя это соотношение, а также квазистационарное приближение, можно вывести выражения для названных равновесных констант и константы активации $К_{акт}$. Эти выражения, в свою очередь, позволят упорядочить имеющиеся экспериментальные данные: беря за основу максимально достоверные оценки, уточнить значения тех констант, измеренные значения которых представляются далекими от истины.



R – регуляторная субъединица, C – каталитическая субъединица, RC – комплекс каталитической субъединицы с регуляторной, RcAMP – R-субъединица, в цАМФ-связывающем сайте которой находится цАМФ RCcAMP – так называемый «тройной комплекс» – комплекс каталитической субъединицы с регуляторной, в цАМФ-связывающем сайте которой находится цАМФ. О возможном строении тройного комплекса – в разделе Б.1.8. На схеме также указаны равновесные константы отдельных процессов (Kd) или константы скоростей реакций

Рисунок Б.1 – Схема активации ПКА, в состав регуляторной субъединицы которой входит только один рабочий цАМФ-связывающий домен

Б.1.2 Определение равновесных констант Kd_1, Kd_2, Kd_3 и Kd_4

$$Kd_4 = \frac{[R]\cdot[C]}{[RC]}, \quad Kd_2 = \frac{[RcAMP]\cdot[C]}{[RCcAMP]}, \quad Kd_3 = \frac{[R]\cdot[cAMP]}{[RcAMP]}, \quad Kd_1 = \frac{[RC]\cdot[cAMP]}{[RCcAMP]}.$$

Из выражений для констант следует:

$$[RC] = \frac{[R]\cdot[C]}{Kd_4}, \qquad [RCcAMP] = \frac{[RcAMP]\cdot[C]}{Kd_2} = \frac{[R]\cdot[cAMP]\cdot[C]}{Kd_3\cdot Kd_2}.$$

Тогда:

$$[RC] + [RCcAMP] = [R]\cdot[C]\cdot\left(\frac{1}{Kd_4} + \frac{[cAMP]}{Kd_3\cdot Kd_2}\right) \qquad (Б.2)$$

Б.1.3. Уравнение Михаэлиса-Ментен

$$\frac{d[CS]}{dt} = k_{+5}[C][S] - k_{-5}[CS] - k_{+6}[CS], \qquad \frac{d[CS]}{dt} = 0$$

Тогда:

$$k_{+5}[C][S] = [CS]\cdot(k_{-5} + k_{+6}) \qquad (Б.3)$$

С другой стороны:

$[C] = [C]_{tot} - [CS] - ([RC] + [RCcAMP])$, где $[C]_{tot}$ – полная концентрация С-субъединиц

$$[C] = [C]_{tot} - [CS] - [R]\cdot[C]\cdot\left(\frac{1}{Kd_4} + \frac{[cAMP]}{Kd_3\cdot Kd_2}\right)$$

$$[C]\cdot\left(1 + [R]\cdot\left(\frac{1}{Kd_4} + \frac{[cAMP]}{Kd_3\cdot Kd_2}\right)\right) = [C]_{tot} - [CS]$$

Обозначим $X = 1 + [R]\cdot\left(\frac{1}{Kd_4} + \frac{[cAMP]}{Kd_3\cdot Kd_2}\right)$, тогда:

$$[C] = \frac{[C]_{tot}}{X} - \frac{[CS]}{X} \qquad (Б.4)$$

Подставим выражение (Б.4) в уравнение (Б.3):

$$k_{+5}\frac{[C]_{tot}}{X}[S] - k_{+5}\frac{[CS]}{X}[S] = [CS]\cdot(k_{-5} + k_{+6})$$

$$k_{+5}\frac{[C]_{tot}}{X}[S] = [CS]\cdot\left(k_{-5} + k_{+6} + \frac{k_{+5}[S]}{X}\right)$$

$$k_{+5}[C]_{tot}[S] = [CS]\cdot((k_{-5} + k_{+6})\cdot X + k_{+5}[S])$$

$$[CS] = \frac{k_{+5}[C]_{tot}[S]}{(k_{-5} + k_{+6})\cdot X + k_{+5}[S]}$$

Разделим и числитель, и знаменатель на k_{+5} и введем стандартное обозначение константы

Михаэлиса $K_m = \frac{k_{-5} + k_{+6}}{k_{+5}}$, тогда

$$[CS] = \frac{[C]_{tot}[S]}{K_m \cdot X + [S]} \qquad \text{(Б.5)}$$

Если бы в системе отсутствовала R-субъединица, то:

$$[CS]_1 = \frac{[C]_{tot}[S]}{K_m + [S]}$$

По условиям задачи скорость реакции в присутствии R-субъединицы должна равняться 50% от скорости реакции в отсутствие субъединицы. Скорость реакции в первом случае равна $k_{+6}[CS]$, а во втором $k_{+6}[CS]_1$. То есть отношение $\frac{[CS]_1}{[CS]}$ должно равняться двум.

$$\frac{K_m \cdot X + [S]}{K_m + [S]} = 2$$

$$K_m \cdot X = 2K_m + [S]$$

$$X = 2 + \frac{[S]}{K_m} \qquad \text{(Б.6)}$$

Б.1.4. Определение концентраций [CS] и [C] в системе

Определим концентрацию [CS], исходя из выражений (Б.5) и (Б.6):

$$[CS] = \frac{[C]_{tot}[S]}{K_m \cdot X + [S]} = \frac{[C]_{tot}[S]}{2K_m + [S] + [S]} = \frac{\frac{1}{2}[C]_{tot}[S]}{K_m + [S]} = \frac{1}{2}[CS]_1 \qquad \text{(Б.7)}$$

Определим концентрацию [C], исходя из выражений (Б.4) и (Б.6):

$$[C] = \frac{[C]_{tot}}{X} - \frac{[CS]}{X} = \frac{[C]_{tot}}{2 + \frac{[S]}{K_m}} - \frac{\frac{1}{2}[C]_{tot}[S]}{\left(2 + \frac{[S]}{K_m}\right) \cdot (K_m + [S])} = \frac{[C]_{tot} \cdot (K_m + [S]) - \frac{1}{2}[C]_{tot}[S]}{\left(2 + \frac{[S]}{K_m}\right) \cdot (K_m + [S])} =$$

$$= \frac{[C]_{tot} \cdot K_m + \frac{1}{2}[C]_{tot}[S]}{\left(2 + \frac{[S]}{K_m}\right) \cdot (K_m + [S])} = \frac{1}{2} K_m \cdot [C]_{tot} \cdot \frac{2 + \frac{[S]}{K_m}}{\left(2 + \frac{[S]}{K_m}\right) \cdot (K_m + [S])} = \frac{1}{2} \cdot \frac{[C]_{tot}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \qquad \text{(Б.8)}$$

Б.1.5. Установление соотношения между концентрациями отдельных компонентов системы

В соответствии с выражениями (Б.2) и (Б.6):

$$[RC] + [RCcAMP] = [R] \cdot [C] \cdot \left(\frac{1}{Kd_4} + \frac{[cAMP]}{Kd_3 \cdot Kd_2} \right) = [C] \cdot (X - 1) =$$

$$= [C] \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) = \frac{1}{2} \cdot \frac{[C]_{tot}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) = \frac{1}{2} \cdot [C]_{tot} \qquad \text{(Б.9)}$$

Так как изначально в системе были только RC комплексы, а свободных R- и C-субъединиц не было, то из выражения (Б.9) следует также, что:

$$[CS] + [C] = \frac{1}{2} \cdot [C]_{tot} \qquad \text{(Б.10)}$$

$$[R] + [RcAMP] = \frac{1}{2} \cdot [C]_{tot} \qquad \text{(Б.11)}$$

Выражение (Б.10) легко проверить, так как концентрации [CS] и [C] уже определены.

$$[CS] + [C] = \frac{\frac{1}{2}[C]_{tot}[S]}{K_m + [S]} + \frac{1}{2} \cdot \frac{[C]_{tot}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} = \frac{\frac{1}{2}[C]_{tot}[S]}{K_m + [S]} + \frac{1}{2} \cdot \frac{[C]_{tot} \cdot K_m}{K_m + [S]} = \frac{1}{2} \cdot [C]_{tot}.$$

Б.1.6. Определение концентрации цАМФ ([cAMP])

В соответствии с принятым в разделе Б.1.3 обозначением:

$X = 1 + [R] \cdot \left(\frac{1}{Kd_4} + \frac{[cAMP]}{Kd_3 \cdot Kd_2}\right)$, тогда:

$$[R] = \frac{X - 1}{\frac{1}{Kd_4} + \frac{[cAMP]}{Kd_3 \cdot Kd_2}} = \frac{1 + \frac{[S]}{K_m}}{\frac{1}{Kd_4} + \frac{[cAMP]}{Kd_3 \cdot Kd_2}} = \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) \cdot \frac{Kd_3 \cdot Kd_2 \cdot Kd_4}{Kd_3 \cdot Kd_2 + Kd_4 \cdot [cAMP]} \qquad \text{(Б.12)}$$

$$[RcAMP] = \frac{[R] \cdot [cAMP]}{Kd_3} = \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) \cdot \frac{Kd_2 \cdot Kd_4 \cdot [cAMP]}{Kd_3 \cdot Kd_2 + Kd_4 \cdot [cAMP]} \qquad \text{(Б.13)}$$

Но исходя из выражения (Б.11) $[R] + [RcAMP] = \frac{1}{2} \cdot [C]_{tot}$, следовательно:

$$\left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) \cdot \frac{Kd_3 \cdot Kd_2 \cdot Kd_4 + Kd_2 \cdot Kd_4 \cdot [cAMP]}{Kd_3 \cdot Kd_2 + Kd_4 \cdot [cAMP]} = \frac{1}{2} \cdot [C]_{tot}$$

$$\frac{Kd_3 \cdot Kd_2 \cdot Kd_4 + Kd_2 \cdot Kd_4 \cdot [cAMP]}{Kd_3 \cdot Kd_2 + Kd_4 \cdot [cAMP]} = \frac{1}{2} \cdot \frac{[C]_{tot}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} = [C]$$

$$Kd_3 \cdot Kd_2 \cdot Kd_4 + Kd_2 \cdot Kd_4 \cdot [cAMP] = [C] \cdot Kd_3 \cdot Kd_2 + [C] \cdot Kd_4 \cdot [cAMP]$$

$$Kd_2 \cdot Kd_4 \cdot [cAMP] - [C] \cdot Kd_4 \cdot [cAMP] = [C] \cdot Kd_3 \cdot Kd_2 - Kd_3 \cdot Kd_2 \cdot Kd_4$$

$$[cAMP] = \frac{Kd_3 \cdot Kd_2 \cdot ([C] - Kd_4)}{Kd_4 \cdot (Kd_2 - [C])} = \frac{Kd_1 \cdot ([C] - Kd_4)}{(Kd_2 - [C])} \qquad \text{(Б.14)}$$

$$K_{акт} = [cAMP] + [RcAMP] + [RCcAMP] \qquad \text{(Б.15)}$$

Б.1.7. Определение концентраций [R], [RcAMP], [RC] и [RCcAMP]

$$[R]=\left(1+\frac{[S]}{K_m}\right)\cdot\frac{Kd_3\cdot Kd_2\cdot Kd_4}{Kd_3\cdot Kd_2+Kd_4\cdot[cAMP]}=\left(1+\frac{[S]}{K_m}\right)\cdot\frac{Kd_4}{1+\frac{Kd_4}{Kd_3\cdot Kd_2}\cdot[cAMP]}=$$

$$=\left(1+\frac{[S]}{K_m}\right)\cdot\frac{Kd_4}{1+\frac{[C]-Kd_4}{Kd_2-[C]}}=\left(1+\frac{[S]}{K_m}\right)\cdot\frac{Kd_4}{\frac{Kd_2-Kd_4}{Kd_2-[C]}}=$$

$$=\left(1+\frac{[S]}{K_m}\right)\cdot\frac{Kd_4\cdot(Kd_2-[C])}{Kd_2-Kd_4} \qquad \text{(Б.16)}$$

$$[RcAMP]=\tfrac{1}{2}\cdot[C]_{tot}-[R]=[C]\cdot\left(1+\frac{[S]}{K_m}\right)-\left(1+\frac{[S]}{K_m}\right)\cdot\frac{Kd_4\cdot(Kd_2-[C])}{Kd_2-Kd_4}=$$

$$=\left(1+\frac{[S]}{K_m}\right)\cdot\left([C]-\frac{Kd_4\cdot(Kd_2-[C])}{Kd_2-Kd_4}\right)=\left(1+\frac{[S]}{K_m}\right)\cdot\frac{[C]\cdot Kd_2-[C]\cdot Kd_4-Kd_4\cdot Kd_2+Kd_4\cdot[C]}{Kd_2-Kd_4}=$$

$$=\left(1+\frac{[S]}{K_m}\right)\cdot\frac{[C]\cdot Kd_2-Kd_4\cdot Kd_2}{Kd_2-Kd_4}=\left(1+\frac{[S]}{K_m}\right)\cdot\frac{Kd_2\cdot([C]-Kd_4)}{Kd_2-Kd_4} \qquad \text{(Б.17)}$$

$$[RC]=\frac{[R]\cdot[C]}{Kd_4}=\left(1+\frac{[S]}{K_m}\right)\cdot\frac{Kd_2-[C]}{Kd_2-Kd_4}\cdot\tfrac{1}{2}\cdot\frac{[C]_{tot}}{1+\frac{[S]}{K_m}}=\frac{\frac{1}{2}\cdot[C]_{tot}\cdot(Kd_2-[C])}{Kd_2-Kd_4}$$

$$[RCcAMP]=\tfrac{1}{2}\cdot[C]_{tot}-[RC]=\tfrac{1}{2}\cdot[C]_{tot}-\frac{\frac{1}{2}\cdot[C]_{tot}\cdot(Kd_2-[C])}{Kd_2-Kd_4}=$$

$$=\frac{\frac{1}{2}\cdot[C]_{tot}\cdot Kd_2-\frac{1}{2}\cdot[C]_{tot}\cdot Kd_4-\frac{1}{2}\cdot[C]_{tot}\cdot Kd_2+\frac{1}{2}\cdot[C]_{tot}\cdot[C]}{Kd_2-Kd_4}=$$

$$=\frac{\frac{1}{2}\cdot[C]_{tot}\cdot([C]-Kd_4)}{Kd_2-Kd_4} \qquad \text{(Б.18)}$$

Б.1.8. Возможные варианты строения комплекса RCcAMP и физический смысл констант Kd_1 и Kd_2

Экспериментальные данные [43, 72, 77, 78] однозначно свидетельствуют в пользу существования и стабильности тройного комплекса RCcAMP. Тем не менее этот комплекс менее прочен, чем RC, (таблица 1.1) и его диссоциации способствует добавление в систему субстрата (на диссоциацию RC комплекса субстрат не влияет). Исходя из этих данных, было предположено [77, 78], что цАМФ, вызывая переход R-субъединицы из H- в B-конформацию, приводит к разрыву всех связей между R- и C-субъединицами, кроме взаимодействия, образованного псевдосубстратной последовательностью R-субъединицы и каталитическим

сайтом С-субъединицы. Для последнего взаимодействия не существует аллостерического механизма разрыва, но наличие в системе высоких концентраций субстрата (S) должно по закону действующих масс привести к преобладанию комплекса CS над комплексом RCcAMP [42].

Несмотря на то, что изложенная гипотеза кажется нам абсолютно логичной и правдоподобной, мы не можем не отметить, что она, видимо, в полной мере относится только к тройным комплексам $R_{AB}CcAMP_2$, на которых она и была сформулирована и для которых характерны наивысшие значения константы диссоциации (Kd_2) близкие к 0,25μM. Комплексы $R_{AB}CcAMP$ и R_ACcAMP, исходя из экспериментальных данных (таблица 1.1), значительно прочнее, а следовательно, при их образовании разрываются далеко не все связи между R- и С-субъединицами. То есть, можно предположить, что существует два конечных варианта структуры комплекса RCcAMP: R_HCcAMP и R_BcAMP:C. Первый гипотетически является результатом докинга цАМФ в комплекс R_HC (R-субъединица находится в H-конформации), а второй, опять же гипотетически, результатом перехода R-субъединицы в составе первого комплекса в B-конформацию. Между этими конечными вариантами можно допустить множество промежуточных, и какой из них реализуется в действительности, зависит только от строения исходного RC комплекса.

Рассмотрим некоторые варианты перехода RC комплекса в цАМФ-связанную форму с последующей диссоциацией на свободную С-субъединицу и комплекс RcAMP.

Введем обозначения: ΔG_{hb} – ΔG перехода R-субъединицы из H- в B-конформацию (этот вклад можно не учитывать, так как согласно экспериментальным данным для A-домена RIα субъединицы он приблизительно равен нулю [31]); ΔG_{IS} – ΔG разрыва взаимодействия R-субъединицы в B-конформации с С-субъединицей (взаимодействия, образованного псевдосубстратной последовательностью R-субъединицы и каталитическим сайтом С-субъединицы); ΔG_{Ch} – ΔG разрыва взаимодействия R-субъединицы в H-конформации с С-субъединицей за вычетом ΔG_{IS} (со стороны R-субъединицы данное взаимодействие опосредуется в основном С-спиралью); ΔG_H – ΔG связывания цАМФ с сайтом в H-конформации; ΔG_{HB} – ΔG связывания цАМФ с сайтом в B-конформации за вычетом ΔG_H.

Вариант 1: $\Delta G_{Ch} = 0$ (рисунок Б.2 А)

R_HC комплекс не существует, так как переходит в R_BC комплекс даже в отсутствие цАМФ. При связывании цАМФ образуется R_BcAMP:C комплекс, при этом константы Kd_1, Kd_2 и Kd_4 определяются по формулам:

$$Kd_1 = \exp\{(\Delta G_H + \Delta G_{HB})/RT\}$$

$$Kd_2 = \exp\{-(\Delta G_{IS})/RT\}$$

$$Kd_4 = \exp\{-(\Delta G_{IS})/RT\}$$

Следует отметить, что этот вариант вряд ли применим к известным комплексам (как дикого типа, так и мутантным), так как в случае его реализации $Kd_4 = Kd_2$. Равенство этих констант, во-первых, противоречит экспериментальным данным (таблица 1.1), а во-вторых, делает невозможным ускорение процесса диссоциации R- и C-субъединиц при помощи цАМФ.

Вариант 2: $|\Delta G_{Ch}| < |\Delta G_{HB}|$ (рисунок Б.2 Б)

При связывании цАМФ образуется R_BcAMP:C комплекс, однако возможно, что его образование идет в две стадии: через комплекс R_HCcAMP, который является результатом докинга цАМФ в связывающий сайт домена в H-конформации. Существование промежуточного (R_HCcAMP) комплекса экспериментально не показано, следовательно, даже если он реализуется, то время его жизни должно быть очень мало. Таким образом, Kd_1, Kd_2 и Kd_4 определяются по формулам:

$$Kd_1 = \exp\{(\Delta G_H + \Delta G_{HB} + \Delta G_{Ch}) / RT\}$$

$$Kd_2 = \exp\{-(\Delta G_{IS}) / RT\}$$

$$Kd_4 = \exp\{-(\Delta G_{IS} + \Delta G_{Ch}) / RT\}$$

Вариант 3: $|\Delta G_{Ch}| = |\Delta G_{HB}|$ (рисунок Б.2 В)

При связывании цАМФ образуется комплекс R_HCcAMP, который находится в равновесии с комплексом R_BcAMP:C. Kd_1, Kd_2 и Kd_4 определяются по формулам:

$$Kd_1 = \exp\{(\Delta G_H / RT\}$$

$$Kd_2 = \exp\{-(\Delta G_{IS}) / RT\}$$

$$Kd_4 = \exp\{-(\Delta G_{IS} + \Delta G_{Ch}) / RT\}$$

Вариант 4: $|\Delta G_{Ch}| > |\Delta G_{HB}|$ (рисунок Б.2 Г)

При связывании цАМФ образуется комплекс R_HCcAMP, который по термодинамическим причинам не может переходить в комплекс R_BcAMP:C.

Kd_1, Kd_2 и Kd_4 определяются по формулам:

$$Kd_1 = \exp\{(\Delta G_H / RT\}$$

$$Kd_2 = \exp\{-(\Delta G_{IS} + \Delta G_{Ch} + \Delta G_{HB}) / RT\}$$

$$Kd_4 = \exp\{-(\Delta G_{IS} + \Delta G_{Ch}) / RT\}$$

Таким образом:

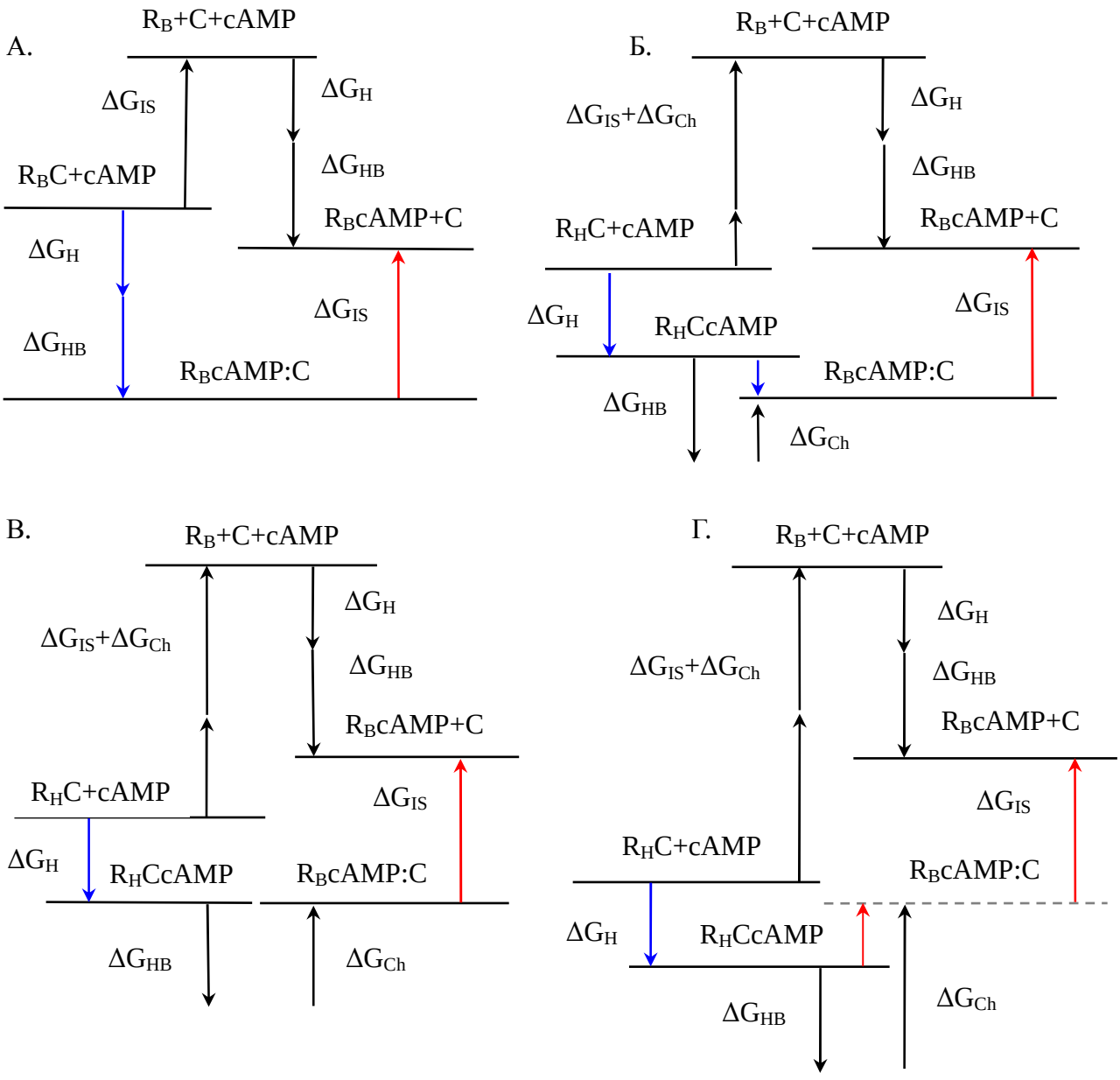
1) минимальное значение Kd_1 наблюдается варианте 1 $Kd_1 = \exp\{(\Delta G_H + \Delta G_{HB}) / RT\}$, а максимальное – в вариантах 3 и 4 $Kd_1 = \exp\{\Delta G_H / RT\}$

2) минимальное значение Kd_2 наблюдается в варианте 4

$Kd_2 = \exp\{-(\Delta G_{IS} + \Delta G_{Ch} + \Delta G_{HB})/RT\}$, а максимальное – в вариантах 1, 2, 3

$Kd_2 = \exp\{-(\Delta G_{IS})/RT\}$

минимальное значение Kd_4 наблюдается в варианте 4 $Kd_4 = \exp\{-(\Delta G_{IS} + \Delta G_{Ch})/RT\}$, а максимальное в варианте 1 $Kd_4 = \exp\{-(\Delta G_{IS})/RT\}$



А – $\Delta G_{Ch} = 0$; Б – $|\Delta G_{Ch}| < |\Delta G_{HB}|$; В – $|\Delta G_{Ch}| = |\Delta G_{HB}|$; Г – $|\Delta G_{Ch}| > |\Delta G_{HB}|$

Синими стрелками обозначены вклады ΔG, отвечающие за значение Kd_1, а красными – за значение Kd_2

Рисунок Б.2 – Варианты перехода RC комплекса в зависимости от его строения в цАМФ-связанную форму с последующей диссоциацией на свободную С-субъединицу и комплекс RcAMP

Б.1.9. Количественная оценка констант Kd1, Kd2, Kd3 и Kd4

В экспериментальных работах исследовано по крайней мере шесть RC комплексов, поведение которых при связывании цАМФ описывается схемой, приведенной в разделе Б.1.1: R_AC WT, R_AC R226A, R_AC L233A, R_AC M234A, $R_{AB}C$ R333K и $R_{AB}C$ R209K.

Комплексы R_AC R226A и R_AC L233A мало отличаются от комплекса R_AC M234A [32], а потому не представляют большого интереса для количественной оценки констант. Рассмотрим остальные комплексы.

Б.1.9.1. Комплекс R_AC WT

Из экспериментальных данных (таблица 1.1) следует, что значение Kd_2 комплекса R_AC WT в любом случае не превышает $2{,}5\cdot10^{-7}$M, то есть предельного значения Kd_2, характеризующего взаимодействие между R- и C-субъединицами в $R_{AB}C$ WT комплексе, оба сайта которого заняты молекулами цАМФ. Как уже отмечалось выше, в этом взаимодействии, вероятно, участвуют только псевдосубстратная последовательность R-субъединицы и каталитический сайт C-субъединицы, и более слабого комплекса R- и C-субъединицы образовывать не могут. Таким образом, используя терминологию рисунка Б.2, можно сказать, что активация комплекса R_AC WT идет по пути, описанному в «Варианте 4». Примем, что нам из данных, приведенных в таблице 1.1, известны значения $Kd_4 = 2{,}0\cdot10^{-10}M$ и $Kd_3 = 1{,}2\cdot10^{-7}M$. Выбранное значение Kd_3 отвечает не только экспериментальным данным, но и сопоставимо с нашими результатами, полученными методом докинга (раздел 3.1.1)[33]. Наиболее неоднозначной и спорной представляется оценка значения Kd_2. Тем не менее основываясь на экспериментальных данных (таблица 1.1) и рассуждениях, приведенных в приложении А, мы приняли в качестве первого грубого приближения значения Kd_2 $6{,}7\cdot10^{-8}$M.

Оценим значения Kd_1 и [cAMP] для комплекса R_AC WT. Исходя из (Б.14), [cAMP] определяется выражением:

$$[cAMP] = \frac{Kd_3 \cdot Kd_2 \cdot ([C] - Kd_4)}{Kd_4 \cdot (Kd_2 - [C])} = \frac{Kd_3 \cdot [C] - Kd_3 \cdot Kd_4}{Kd_4 - Kd_4 \cdot \dfrac{[C]}{Kd_2}}$$

Чем больше значение Kd_2, тем меньше концентрация цАМФ, необходимая для активации ПКА Iα наполовину. Если $Kd_2 = 2{,}5\cdot10^{-7}M$, то есть максимальному своему значению, приближенную минимальную концентрацию цАМФ ($[cAMP]_{min}$) для известных значений Kd_3 и Kd_4 можно определить по формуле (Б.19).

---

[33] Значению $Kd_3 = 1{,}2\cdot10^{-7}M$ соответствует изменение свободной энергии ΔG_{300}, равное -39,5 кДж/моль. Исходя же из наших расчетов, ΔG_{300} = -38,7±5,8 кДж/моль, а соответствующее значение Kd_3 равняется $1{,}8\cdot10^{-7}$M.

$$[cAMP]_{\min} = \frac{Kd_3 \cdot [C] - Kd_3 \cdot Kd_4}{Kd_4 - Kd_4 \cdot \frac{[C]}{Kd_2}} \approx \frac{Kd_3 \cdot [C]}{Kd_4} - Kd_3 \qquad \text{(Б.19)}$$

Максимальная концентрация цАМФ, достигаемая при $Kd_2 \to [C]$, как видно из выражения Б.14, стремится к бесконечности.

Значение Kd_1, при условии того, что известны значения Kd_2, Kd_3 и Kd_4, однозначно определяется по формуле (Б.1).

$$Kd_1 = \frac{Kd_3 \cdot Kd_2}{Kd_4}$$

Исходя из численных приближений, принятых в данном разделе, получены следующие значения Kd_1 и $K_{акт}$:

1) $Kd_1 = 4{,}0 \cdot 10^{-5}$M, причем это значение константы, ввиду активации комплекса R_AC WT по пути «Вариант 4», характеризует связывание цАМФ с А-доменом, находящимся в Н-конформации в составе RC комплекса. Такая оценка константы довольно сильно отличается от имеющихся экспериментальных данных (таблица 1.1), однако в обзоре литературы нами указывались причины, по которым эти экспериментальные данные можно поставить под сомнение (раздел 1.6.2.2). В то же время различия между оцененным значением константы и полученным в ходе докинга не столь явственны. Значению константы $4{,}0 \cdot 10^{-5}$M соответствует изменение свободной энергии ΔG_{300} = -25,3 кДж/моль, а в ходе докинга получено значение ΔG_{304} ($\approx \Delta G_{300}$) равное -24,6±3,7 кДж/моль, чему соответствует $Kd_1 \approx 5{,}2 \cdot 10^{-5}$M.
2) Значение константы активации ($K_{акт}$) оценено как $9{,}5 \cdot 10^{-7}$M, при условиях что $[C]_{tot} = 2{,}5 \cdot 10^{-8}$ M, [S] = $1{,}0 \cdot 10^{-4}$M, $K_m = 1{,}6 \cdot 10^{-5}$M. Такая оценка вполне согласуется с экспериментальными данными (таблица 1.2).

Все полученные оценки суммированы в таблице Б.1

Б.1.9.2. Комплекс R_AC M234A

Комплексы R_AC WT и R_AC M234A, очевидно, различаются только значением ΔG_{Ch}, что позволяет при оценке значений констант рассматривать их в совокупности. Судя по значениям Kd_4 (таблица 1.1), комплекс R_AC WT крепче комплекса R_AC M234A, то есть для комплекса R_AC WT характерно большее значение ΔG_{Ch}. Активация комплекса R_AC WT идет по пути, описанному в «Варианте 4». Следовательно, активация комплекса R_AC M234A может идти по путям «Вариант 2», «Вариант 3» или «Вариант 4». (Путь «Вариант 1» не рассматривается по причинам, изложенным в разделе Б.1.8.).

Примем, что нам из данных, приведенных в таблицах 1.1 и 1.2, известны значения

$Kd_3 = 1{,}2 \cdot 10^{-7} M$ (значения Kd_3 для комплексов R_AC WT и R_AC M234A равны друг другу) и $K_{акт} = 2{,}8 \cdot 10^{-8} M$.

Решение 1.

Найдем значения констант, характеризующих активацию комплекса R_AC M234A по путям «Вариант 4» или «Вариант 3». При этом на систему накладываются дополнительные условия: значения Kd_1 для комплексов R_AC WT и R_AC M234A равны друг другу, а $Kd_2 \le 2{,}5 \cdot 10^{-7} M$.

Принимая за значение Kd_1 соответствующее значение, определенное в разделе Б.1.9.1, запишем соотношение (Б.14) в виде:

$$[cAMP] = \frac{Kd_3 \cdot Kd_2 \cdot ([C] - Kd_4)}{Kd_4 \cdot (Kd_2 - [C])} = Kd_1 \cdot \frac{[C] - Kd_4}{Kd_2 - [C]} \qquad \text{(Б.20)}$$

В соответствии с формулой (Б.1):

$$Kd_2 = \frac{Kd_1 \cdot Kd_4}{Kd_3} \qquad \text{(Б.21)}$$

Подставим (Б.21) в (Б.20) и выразим Kd_4.

$$[cAMP] = Kd_1 \cdot \frac{[C] - Kd_4}{\frac{Kd_1 \cdot Kd_4}{Kd_3} - [C]} = Kd_1 \cdot Kd_3 \frac{[C] - Kd_4}{Kd_1 \cdot Kd_4 - Kd_3 \cdot [C]}$$

$$[cAMP] \cdot Kd_1 \cdot Kd_4 - [cAMP] \cdot Kd_3 \cdot [C] = Kd_1 \cdot Kd_3 \cdot [C] - Kd_1 \cdot Kd_3 \cdot Kd_4$$

$$[cAMP] \cdot Kd_1 \cdot Kd_4 + Kd_1 \cdot Kd_3 \cdot Kd_4 = Kd_1 \cdot Kd_3 \cdot [C] + [cAMP] \cdot Kd_3 \cdot [C]$$

$$Kd_4 = \frac{Kd_3 \cdot [C] \cdot (Kd_1 + [cAMP])}{Kd_1 \cdot ([cAMP] + Kd_3)} = \frac{Kd_3 \cdot [C]}{[cAMP] + Kd_3} + \frac{Kd_3 \cdot [C]}{[cAMP] + Kd_3} \cdot \frac{[cAMP]}{Kd_1} \qquad \text{(Б.22)}$$

Определим значение Kd_2 по формуле (Б.21) и проверим выполнение соотношения $Kd_2 \le 2{,}5 \cdot 10^{-7} M$. Если $Kd_2 > 2{,}5 \cdot 10^{-7}$M, в рамках решения 1 не существует значений констант, удовлетворяющих всем заданным условиям, и следует переходить к решению 2.

Решение 2.

Найдем значения констант, характеризующих активацию комплекса R_AC M234A по пути «Вариант 2». При этом на систему накладывается условие: $Kd_2 = 2{,}5 \cdot 10^{-7} M$.

В соответствии с выражением (Б.14):

$$[cAMP] = \frac{Kd_3 \cdot Kd_2 \cdot ([C] - Kd_4)}{Kd_4 \cdot (Kd_2 - [C])}$$

Выразим Kd_4:

$$[cAMP] \cdot Kd_4 \cdot (Kd_2 - [C]) = Kd_3 \cdot Kd_2 \cdot ([C] - Kd_4)$$
$$[cAMP] \cdot Kd_4 \cdot (Kd_2 - [C]) + Kd_3 \cdot Kd_2 \cdot Kd_4 = Kd_3 \cdot Kd_2 \cdot [C]$$

$$Kd_4 \cdot ([cAMP] \cdot Kd_2 - [cAMP] \cdot [C] + Kd_3 \cdot Kd_2) = Kd_3 \cdot Kd_2 \cdot [C]$$

$$Kd_4 = \frac{Kd_3 \cdot Kd_2 \cdot [C]}{[cAMP] \cdot Kd_2 - [cAMP] \cdot [C] + Kd_3 \cdot Kd_2}$$

$$Kd_4 = \frac{Kd_3 \cdot [C]}{[cAMP] + Kd_3 - \frac{[cAMP] \cdot [C]}{Kd_2}} \qquad \text{(Б.23)}$$

Значение Kd_1 определяется в соответствии с выражением (Б.1):

$$Kd_1 = \frac{Kd_2 \cdot Kd_3}{Kd_4}$$

Сложность решения этой задачи состоит в том, что нам не известно значение [cAMP], а только значение $K_{акт}$, связанное с [cAMP] соотношением (Б.15): $K_{акт} = [cAMP] + [RcAMP] + [RCcAMP]$. Однако численно, итеративным путем, можно подобрать такое значение [cAMP], при котором значение $K_{акт}$ совпадает с полученным в эксперименте.

В результате, с учетом экспериментальных данных и наших оценок активации комплекса R_AC WT, имеем (см. таблица Б.1):

1) активация комплекса R_AC M234A проходит по пути «Вариант 2». Kd_2 при этом принимает максимальное возможное значение $2{,}5 \cdot 10^{-7}$М.
2) $Kd_4 = 1{,}4 \cdot 10^{-9}$М, что несколько превышает значение, полученное экспериментально ($1{,}1 \cdot 10^{-9}$М).
3) $Kd_1 = 2{,}1 \cdot 10^{-5}$М, причем это значение константы, ввиду активации комплекса по пути «Вариант 2», меньше константы докинга цАМФ в цАМФ-связывающий сайт А-домена, находящегося в Н-конформации.

Б.1.9.3. Комплекс R_{AB}C R333K

Исходя из всех имеющихся экспериментальных данных (таблица 1.1) Kd_2 комплекса R_{AB}C R333K много меньше критического значения $2{,}5 \cdot 10^{-7}$М, а следовательно, этот комплекс активируется по пути «Вариант 4». В таком случае значения Kd_1 для комплексов R_{AB}C R333K и R_AC WT должны совпадать и в соответствии с полученными выше оценками составлять $4{,}0 \cdot 10^{-5}$М. Примем также, что нам из эксперимента известно значение Kd_4 и $K_{акт}$: $Kd_4 = 6{,}0 \cdot 10^{-11} M$, $K_{акт} = 1{,}8 \cdot 10^{-6} M$.

Запишем выражение для Kd_2.

С одной стороны

$$Kd_3 = \frac{Kd_1 \cdot Kd_4}{Kd_2} \qquad \text{(Б.24)}$$

С другой стороны, преобразуя выражение (Б.14), имеем:

$$Kd_3 = [cAMP] \cdot \left\{ \frac{Kd_4}{[C] - Kd_4} - \frac{1}{Kd_2} \cdot \frac{Kd_4 \cdot [C]}{([C] - Kd_4)} \right\} \qquad (Б.25)$$

Приравняем выражения (Б.24) и (Б.25):

$$\frac{Kd_4 \cdot [cAMP]}{[C] - Kd_4} - \frac{[cAMP]}{Kd_2} \cdot \frac{Kd_4 \cdot [C]}{([C] - Kd_4)} = \frac{Kd_1 \cdot Kd_4}{Kd_2}$$

$$Kd_2 \cdot \frac{Kd_4 \cdot [cAMP]}{[C] - Kd_4} - [cAMP] \cdot \frac{Kd_4 \cdot [C]}{([C] - Kd_4)} = Kd_1 \cdot Kd_4$$

$$Kd_2 \cdot \frac{Kd_4 \cdot [cAMP]}{[C] - Kd_4} = Kd_1 \cdot Kd_4 + [cAMP] \cdot \frac{Kd_4 \cdot [C]}{([C] - Kd_4)}$$

$$Kd_2 = \frac{Kd_1 \cdot ([C] - Kd_4)}{[cAMP]} + [C] \qquad (Б.26)$$

$$Kd_3 = \frac{Kd_1 \cdot Kd_4}{Kd_2} = \frac{Kd_1 \cdot Kd_4 \cdot [cAMP]}{Kd_1 \cdot ([C] - Kd_4) + [C] \cdot [cAMP]} \qquad (Б.27)$$

Перед тем как оценить численные значения констант, проверим, согласуются ли между собой значения Kd_1, Kd_4 и [cAMP].

Вариация [cAMP] демонстрирует, что с увеличением [cAMP] значение Kd_2 уменьшается, а Kd_3, напротив, увеличивается, но до некоторого предела. Предельное значение Kd_3 ($Kd_{3\lim}$) можно оценить, исходя из соотношения (Б.27). Если [cAMP]$\to+\infty$, то $Kd_3 \to Kd_{3\lim} = \frac{Kd_1 \cdot Kd_4}{[C]}$. С другой стороны, очевидно, что значение Kd_3 для комплекса R_{AB}C R333K должно быть меньше или равно соответствующему значению для комплекса R_AC WT. Такое соотношение должно выполняться, потому как в комплексе R_{AB}C R333K присутствует остаток W260, кэпирующий лиганд. Возможно, что этот остаток и не формирует с лигандом такое сильное взаимодействие, как в комплексе R_{AB}C. Ведь для сильного взаимодействия нужна правильная ориентация ароматического кольца W260, а ей способствует присутствие лиганда в цАМФ-связывающем сайте B-домена. Однако даже если взаимодействие между ароматическими кольцами не реализуется, лиганд все равно не будет связываться A-сайтом R_{AB}C R333K комплекса слабее, чем A-сайтом R_AC комплекса. Поэтому, если обозначить $Kd_{3\max} = K'd_3$ (где $K'd_3$ – значение константы для R_AC WT комплекса) и допустить, что $Kd_{3\max} < Kd_{3\lim}$, на [cAMP] нужно наложить дополнительное условие: $[cAMP] < [cAMP]_{\max}$, где $[cAMP]_{\max}$ – концентрация цАМФ, соответствующая $Kd_{3\max}$.

Найдем $[cAMP]_{\max}$.

$$Kd_{3\max} = \frac{Kd_1 \cdot Kd_4 \cdot [cAMP]_{\max}}{Kd_1 \cdot ([C] - Kd_4) + [C] \cdot [cAMP]_{\max}}$$

$$Kd_{3\max} \cdot Kd_1 \cdot ([C] - Kd_4) + Kd_{3\max} \cdot [C] \cdot [cAMP]_{\max} = Kd_1 \cdot Kd_4 \cdot [cAMP]_{\max}$$

$$Kd_{3\max} \cdot Kd_1 \cdot ([C] - Kd_4) = Kd_1 \cdot Kd_4 \cdot [cAMP]_{\max} - Kd_{3\max} \cdot [C] \cdot [cAMP]_{\max}$$

$$Kd_{3\max} \cdot Kd_1 \cdot ([C] - Kd_4) = [cAMP]_{\max} \cdot (Kd_1 \cdot Kd_4 - Kd_{3\max} \cdot [C])$$

$$[cAMP]_{\max} = \frac{Kd_{3\max} \cdot Kd_1 \cdot ([C] - Kd_4)}{Kd_1 \cdot Kd_4 - Kd_{3\max} \cdot [C]} \qquad \text{(Б.28)}$$

Если $Kd_{3max} = 1{,}2 \cdot 10^{-7}$M (см. раздел Б.1.9.1), то $[cAMP]_{max} = 2{,}8 \cdot 10^{-6}$M

Таким образом, значение $[cAMP]_{max}$ превышает значение $1{,}8 \cdot 10^{-6}$M, полученное в эксперименте, а следовательно, принятые нами значения Kd_1, Kd_4 и [cAMP] согласуются между собой. Оценим значения остальных констант (см. таблица Б.1):

1) $Kd_3 = 7{,}8 \cdot 10^{-8}$M. Такое значение константы связывания меньше, чем для комплекса R_AC ($1{,}2 \cdot 10^{-7}$M), но больше чем для комплекса $R_{AB}C$ WT ($5{,}6 \cdot 10^{-8}$M, как следует из экспериментальных данных), что подтверждает корректность произведенной оценки.
2) $Kd_2 = 3{,}1 \cdot 10^{-8}$M, что более чем на порядок больше значения, полученного экспериментально (см. таблица 1.1). Однако экспериментальное значение представляется далеким от истины, так как маловероятно, чтобы комплексы $R_{AB}C$ R333K и $R_{AB}C$ R209K имели одно и то же значение Kd_2, как то получено в эксперименте.

Б.1.9.4. Комплекс $R_{AB}C$ R209K

В мутантном комплексе $R_{AB}C$ R209K цАМФ связывает не А-домен, а В-домен, поэтому ни один из путей, предложенных на рисунке Б.2 не подходит к описанию этой системы. Тем не менее приведенные выше соотношения между константами остаются справедливыми.

Примем, что нам из эксперимента известны значения $Kd_4 = 4{,}0 \cdot 10^{-11} M$, $Kd_1 = 6{,}0 \cdot 10^{-7} M$ и $K_{акт} = 1{,}7 \cdot 10^{-6} M$.

При оценке значений констант будем пользоваться соотношениями (Б.26) и (Б.27):

$$Kd_2 = \frac{Kd_1 \cdot ([C] - Kd_4)}{[cAMP]} + [C] \qquad \text{(Б.26)}$$

$$Kd_3 = \frac{Kd_1 \cdot Kd_4}{Kd_2} = \frac{Kd_1 \cdot Kd_4 \cdot [cAMP]}{Kd_1 \cdot ([C] - Kd_4) + [C] \cdot [cAMP]} \qquad \text{(Б.27)}$$

В результате получаем (см. таблица Б.1):

1) $Kd_2 = 1{,}9 \cdot 10^{-9}$M
2) $Kd_3 = 1{,}3 \cdot 10^{-8}$M

Оба оцененных значения находятся в хорошем соответствии с экспериментальными данными (таблица 1.1)

Таблица Б.1 – Значения констант, характеризующих активацию ПКА Iα с одним доступным для лиганда сайтом связывания

Константа	Значение, М	Источник значения константы
R_AC WT		
Kd_1	$4{,}0\cdot10^{-5}$	Оценена в разделе Б.1.9.1
Kd_2	$6{,}7\cdot10^{-8}$	Эксперимент (таблица 1.1, прил. А)
Kd_3	$1{,}2\cdot10^{-7}$	Эксперимент (таблица 1.1)
Kd_4	$2{,}0\cdot10^{-10}$	Эксперимент (таблица 1.1)
$K_{акт}/[C]_{tot}$	$9{,}5\cdot10^{-7}/2{,}5\cdot10^{-8}$	Оценена в разделе Б.1.9.1
R_AC M234A		
Kd_1	$2{,}1\cdot10^{-5}$	Оценена в разделе Б.1.9.2
Kd_2	$2{,}5\cdot10^{-7}$	Оценена в разделе Б.1.9.2
Kd_3	$1{,}2\cdot10^{-7}$	Эксперимент (таблица 1.1)
Kd_4	$1{,}42\cdot10^{-9}$	Оценена в разделе Б.1.9.2
$K_{акт}/[C]_{tot}$	$2{,}8\cdot10^{-8}/2{,}5\cdot10^{-8}$	Эксперимент (таблица 1.2)
$R_{AB}C$ R333K		
Kd_1	$4{,}0\cdot10^{-5}$	Оценена в разделе Б.1.9.1
Kd_2	$3{,}1\cdot10^{-8}$	Оценена в разделе Б.1.9.3
Kd_3	$7{,}8\cdot10^{-8}$	Оценена в разделе Б.1.9.3
Kd_4	$6{,}0\cdot10^{-11}$	Эксперимент (таблица 1.1)
$K_{акт}/[C]_{tot}$	$1{,}8\cdot10^{-6}/2{,}0\cdot10^{-8}$	Эксперимент (таблица 1.2)
$R_{AB}C$ R209K		
Kd_1	$6{,}0\cdot10^{-7}$	Эксперимент (таблица 1.1)
Kd_2	$1{,}86\cdot10^{-9}$	Оценена в разделе Б.1.9.4
Kd_3	$1{,}3\cdot10^{-8}$	Оценена в разделе Б.1.9.4
Kd_4	$4{,}0\cdot10^{-11}$	Эксперимент (таблица 1.1)
$K_{акт}/[C]_{tot}$	$1{,}7\cdot10^{-6}/2{,}0\cdot10^{-8}$	Эксперимент (таблица 1.2)

Б.2. $R_{AB}C$ комплекс

Б.2.1. Схема процессов и постановка задачи

Для проверки оценки, сделанной в предыдущем разделе, нами была также построена модель активации RC комплекса, в состав которого входит R-субъединица, не несущая мутаций, а следовательно, связывающая две молекулы цАМФ. Схема процессов, лежащих в основе этой модели, показана на рисунке (рисунок Б.3).

Из приведенной схемы вытекает ряд важных соотношений между равновесными константами, базирующихся на принципе независимости изменения свободной энергии реакции от ее пути.

$$Kd_4 \cdot Kd_{1A} = Kd_{3A} \cdot Kd_{2A} \quad \text{(Б.29)}$$

$$Kd_{2A} \cdot Kd_{1B}^{A} = Kd_{3B}^{A} \cdot Kd_2 \quad \text{(Б.30)}$$

$$Kd_4 \cdot Kd_{1B} = Kd_{3B} \cdot Kd_{2B} \quad \text{(Б.31)}$$

$$Kd_{2B} \cdot Kd_{1A}^{B} = Kd_{3A}^{B} \cdot Kd_2 \quad \text{(Б.32)}$$

$$Kd_{1A} \cdot Kd_{1B}^{A} = Kd_{1B} \cdot Kd_{1A}^{B} \quad \text{(Б.33)}$$

$$Kd_{3A} \cdot Kd_{3B}^{A} = Kd_{3B} \cdot Kd_{3A}^{B} \quad \text{(Б.34)}$$

Так как с $R_{AB}C$ комплексом и R-субъединицей дикого типа связывается по две молекулы цАМФ, то теоретически представляется возможным рассчитать значения средних констант связывания цАМФ с этими системами (Kd_{RC}^2 и Kd_R^2). Они определяются формулами:

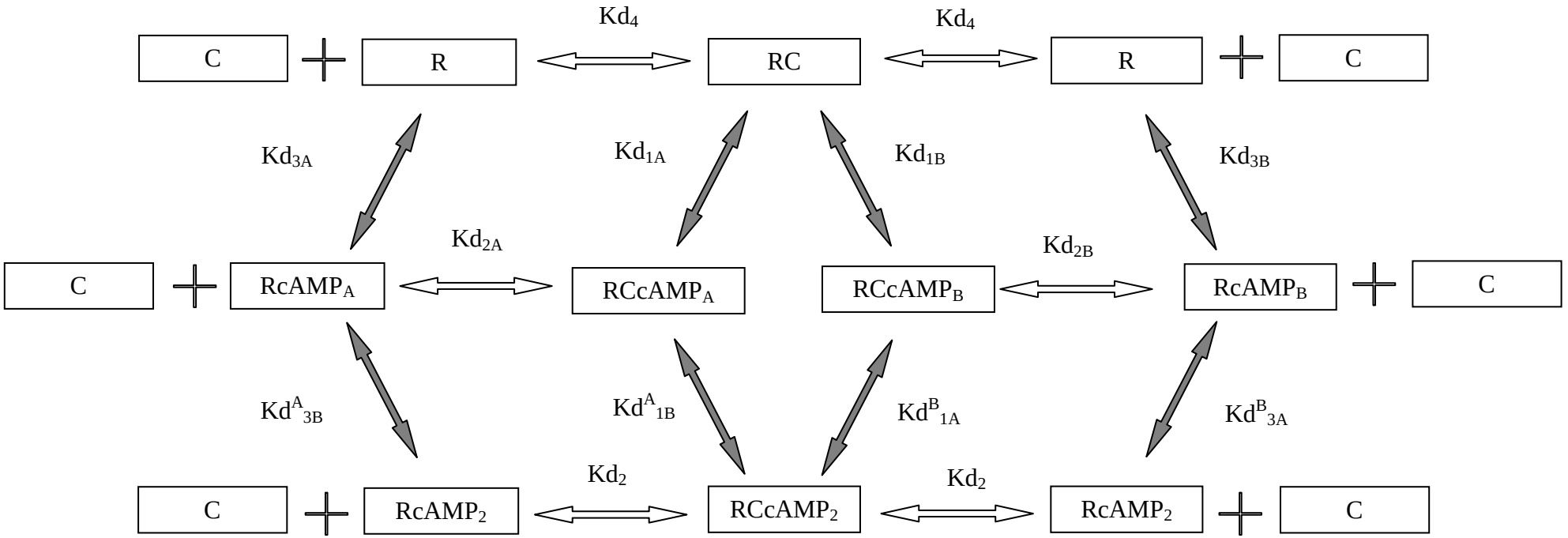
$$Kd_{RC}^2 = \frac{[RC] \cdot [cAMP]^2}{[RCcAMP_2]} \qquad Kd_R^2 = \frac{[R] \cdot [cAMP]^2}{[RcAMP_2]}$$

При этом для этих констант будут справедливы равенства, вытекающие из принципа независимости изменения свободной энергии реакции от ее пути:

$$Kd_{1A} \cdot Kd_{1B}^{A} = Kd_{1B} \cdot Kd_{1A}^{B} = Kd_{RC}^2 \quad \text{(Б.35)}$$

$$Kd_{3A} \cdot Kd_{3B}^{A} = Kd_{3B} \cdot Kd_{3A}^{B} = Kd_R^2 \quad \text{(Б.36)}$$

Насколько можно понять из описаний проведения экспериментов, авторы экспериментальных работ, если не упоминают, связывание с каким из доменов они изучают, пытаются измерить квадратные корни из этих констант. Нам представляется, что такие измерения достаточно сложно провести корректно, если в принципе возможно, потому что концентрация в системе комплексов $RcAMP_A$, $RcAMP_B$, $RCcAMP_A$ и $RCcAMP_B$ отнюдь не стремится к нулю. Реально, на наш взгляд, получается найти такую концентрацию цАМФ, при которой половина из всех существующих цАМФ-связывающих сайтов занята лигандом, но при этом нельзя сказать, что половина всех RC комплексов находится в состоянии $RCcAMP_2$, или же половина всех R-субъединиц находится в состоянии $RcAMP_2$. Поэтому полученные в ходе экспериментальных измерений оценки квадратных корней из данных констант нам представляются весьма приблизительными, и опираться на них в расчетах мы не будем. Однако основываясь на соотношениях (Б.35) и (Б.36), мы попытаемся оценить истинные значения $Kd_{RC} = \sqrt{Kd_{RC}^2}$ и $Kd_R = \sqrt{Kd_R^2}$ и сравним их с имеющимися экспериментальными данными.



R – регуляторная субъединица; C – каталитическая субъединица; RC – комплекс каталитической субъединицы с регуляторной; $RCcAMP_A$ – комплекс каталитической субъединицы с регуляторной, в цАМФ-связывающем сайте А-домена которой находится цАМФ; $RCcAMP_B$ – комплекс каталитической субъединицы с регуляторной, в цАМФ-связывающем сайте В-домена которой находится цАМФ; $RCcAMP_2$ – комплекс каталитической субъединицы с регуляторной, в обоих цАМФ-связывающих сайтах которой находится цАМФ; $RcAMP_A$ – R-субъединица, в цАМФ-связывающем сайте А-домена которой находится цАМФ; $RcAMP_B$ – R-субъединица, в цАМФ-связывающем сайте В-домена которой находится цАМФ; $RcAMP_2$ – R-субъединица, в обоих цАМФ-связывающих сайтах которой находится цАМФ. На схеме также указаны равновесные константы отдельных процессов Kd (пояснения в тексте)

Рисунок Б.3 – Схема активации ПКА, в состав регуляторной субъединицы которой входят два доступных для лиганда цАМФ-связывающих домена

Б.2.2 Вывод соотношений для оценки равновесных констант

Воспользуемся соотношениями (Б.9) – (Б.11). Тогда:

$$[R]+[RcAMP_A]+[RcAMP_B]+[RcAMP_2]=\frac{1}{2}\cdot[C]_{tot} \qquad (Б.37)$$

$$[R]+[RCcAMP_A]+[RCcAMP_B]+[RCcAMP_2]=\frac{1}{2}\cdot[C]_{tot} \qquad (Б.38)$$

Запишем выражения для некоторых из равновесных констант:

$$Kd_{3A}=\frac{[R]\cdot[cAMP]}{[RcAMP_A]}\Rightarrow[RcAMP_A]=\frac{[R]\cdot[cAMP]}{Kd_{3A}}$$

$$Kd_{3B}=\frac{[R]\cdot[cAMP]}{[RcAMP_B]}\Rightarrow[RcAMP_B]=\frac{[R]\cdot[cAMP]}{Kd_{3B}}$$

$$Kd_{3A}^{B}=\frac{[RcAMP_B]\cdot[cAMP]}{[RcAMP_2]}\Rightarrow[RcAMP_2]=\frac{[RcAMP_B]\cdot[cAMP]}{Kd_{3A}^{B}}=\frac{[R]\cdot[cAMP]^2}{Kd_{3A}^{B}\cdot Kd_{3B}}$$

$$Kd_4=\frac{[R]\cdot[C]}{[RC]}\Rightarrow[RC]=\frac{[R]\cdot[C]}{Kd_4}$$

$$Kd_{1A}=\frac{[RC]\cdot[cAMP]}{[RCcAMP_A]}\Rightarrow[RCcAMP_A]=\frac{[RC]\cdot[cAMP]}{Kd_{1A}}=\frac{[R]\cdot[C]\cdot[cAMP]}{Kd_4\cdot Kd_{1A}}$$

$$Kd_{1B}=\frac{[RC]\cdot[cAMP]}{[RCcAMP_B]}\Rightarrow[RCcAMP_B]=\frac{[RC]\cdot[cAMP]}{Kd_{1B}}=\frac{[R]\cdot[C]\cdot[cAMP]}{Kd_4\cdot Kd_{1B}}$$

$$Kd_2=\frac{[RcAMP_2]\cdot[C]}{[RCcAMP_2]}\Rightarrow[RCcAMP_2]=\frac{[RcAMP_2]\cdot[C]}{Kd_2}=\frac{[R]\cdot[C]\cdot[cAMP]^2}{Kd_2\cdot Kd_{3B}\cdot Kd_{3A}^{B}}$$

Подставим приведенные выражения в соотношения (Б.37) и (Б.38):

$$[R]\cdot\left\{1+\frac{[cAMP]}{Kd_{3A}}+\frac{[cAMP]}{Kd_{3B}}+\frac{[cAMP]^2}{Kd_{3B}\cdot Kd_{3A}^{B}}\right\}=\frac{1}{2}\cdot[C]_{tot} \qquad (Б.39)$$

$$[R]\cdot[C]\cdot\left\{\frac{1}{Kd_4}+\frac{[cAMP]}{Kd_4\cdot Kd_{1A}}+\frac{[cAMP]}{Kd_4\cdot Kd_{1B}}+\frac{[cAMP]^2}{Kd_2\cdot Kd_{3B}\cdot Kd_{3A}^{B}}\right\}=\frac{1}{2}\cdot[C]_{tot} \qquad (Б.40)$$

Приравняем выражения (Б.39) и (Б.40), поделим обе части равенства на [R] и домножим на ($Kd_2\cdot Kd_4\cdot Kd_{1A}\cdot Kd_{1B}\cdot Kd_{3A}\cdot Kd_{3B}\cdot Kd_{3A}^{B}$):

Левая часть равенства:

$$Kd_2\cdot Kd_4\cdot Kd_{1A}\cdot Kd_{1B}\cdot Kd_{3A}\cdot Kd_{3B}\cdot Kd_{3A}^{B}+[cAMP]\cdot Kd_2\cdot Kd_4\cdot Kd_{1A}\cdot Kd_{1B}\cdot Kd_{3B}\cdot Kd_{3A}^{B}+$$
$$+[cAMP]\cdot Kd_2\cdot Kd_4\cdot Kd_{1A}\cdot Kd_{1B}\cdot Kd_{3A}\cdot Kd_{3A}^{B}+[cAMP]^2\cdot Kd_2\cdot Kd_4\cdot Kd_{1A}\cdot Kd_{1B}\cdot Kd_{3A}$$

Правая часть равенства:

$$[C]\cdot Kd_2\cdot Kd_{1A}\cdot Kd_{1B}\cdot Kd_{3A}\cdot Kd_{3B}\cdot Kd_{3A}^{B}+[cAMP]\cdot[C]\cdot Kd_2\cdot Kd_{1B}\cdot Kd_{3A}\cdot Kd_{3B}\cdot Kd_{3A}^{B}+$$
$$+[cAMP]\cdot[C]\cdot Kd_2\cdot Kd_{1A}\cdot Kd_{3A}\cdot Kd_{3B}\cdot Kd_{3A}^{B}+[cAMP]^2\cdot[C]\cdot Kd_4\cdot Kd_{1A}\cdot Kd_{1B}\cdot Kd_{3A}$$

Перегруппируем члены и запишем квадратное уравнение относительно [cAMP]:

$$a \cdot [cAMP]^2 + b \cdot [cAMP] + c = 0$$

$$a = Kd_4 \cdot Kd_{1A} \cdot Kd_{1B} \cdot Kd_{3A} \cdot (Kd_2 - [C])$$

$$b = Kd_2 \cdot Kd_4 \cdot Kd_{1A} \cdot Kd_{1B} \cdot Kd_{3A}^B \cdot (Kd_{3B} + Kd_{3A}) - [C] \cdot Kd_2 \cdot Kd_{3A} \cdot Kd_{3B} \cdot Kd_{3A}^B \cdot (Kd_{1B} + Kd_{1A})$$

$$c = Kd_2 \cdot Kd_{1A} \cdot Kd_{1B} \cdot Kd_{3A} \cdot Kd_{3B} \cdot Kd_{3A}^B \cdot (Kd_4 - [C])$$

Решение квадратного уравнения:

$$D = b^2 - 4 \cdot a \cdot c$$

$$[cAMP] = \frac{-b \pm \sqrt{D}}{2 \cdot a} \qquad \text{(Б.41)}$$

Б.2.3. Определение концентрации компонентов системы

Концентрации [CS] и [C] определяются в соответствии с соотношениями (Б.7) и (Б.8).

Исходя из (Б.39), можно определить концентрацию свободной R-субъединицы:

$$[R] = \frac{1/2 \cdot [C]_{tot}}{1 + \frac{[cAMP]}{Kd_{3A}} + \frac{[cAMP]}{Kd_{3B}} + \frac{[cAMP]^2}{Kd_{3B} \cdot Kd_{3A}^B}}$$

Концентрации остальных компонентов смеси равны:

$$[RcAMP_A] = \frac{[R] \cdot [cAMP]}{Kd_{3A}}$$

$$[RcAMP_B] = \frac{[R] \cdot [cAMP]}{Kd_{3B}}$$

$$[RcAMP_2] = \frac{[R] \cdot [cAMP]^2}{Kd_{3A}^B \cdot Kd_{3B}}$$

$$[RC] = \frac{[R] \cdot [C]}{Kd_4}$$

$$[RCcAMP_A] = \frac{[R] \cdot [C] \cdot [cAMP]}{Kd_4 \cdot Kd_{1A}}$$

$$[RCcAMP_B] = \frac{[R] \cdot [C] \cdot [cAMP]}{Kd_4 \cdot Kd_{1B}}$$

$$[RCcAMP_2] = \frac{[R] \cdot [C] \cdot [cAMP]^2}{Kd_2 \cdot Kd_{3B} \cdot Kd_{3A}^B}$$

Б.2.4. Количественная оценка равновесных констант и $K_{акт}$

Воспользуемся оценками, полученными в разделе Б.1.9, и примем:

Kd_{1A} = 4,0·10^{-5} М, Kd_{3A} = 7,8·10^{-8} М, Kd_{3B} = 1,3·10^{-8} М. Также, учитывая экспериментальные данные (таблица 1.1), примем: Kd_2 = 2,5·10^{-7} М (предельное значение Kd_2, характеризующее, по всей видимости, взаимодействие между R- и C-субъединицами только за счет каталитического сайта и псевдосубстратной последовательности, и характерное для $R_{AB}C$ WT комплекса), Kd_{1B} = 6,0·10^{-7} М и $Kd_{3A}^{B} = 5{,}6 \cdot 10^{-8} M$.

Значение [cAMP] определим по формуле (Б.41). Значения остальных равновесных констант установим, используя приведенные в предыдущем абзаце экспериментальные данные и соотношения (Б.29) – (Б.34). Рассчитав концентрации компонентов системы, как указано в разделе Б.2.3, получим численную оценку $K_{акт}$.

Исходя из данных, приведенных в таблице 1.1, среднее значение Kd_4 составляет 1,45·10^{-10} М. Однако решение задачи с этим значением приводит к неудовлетворительным результатам: значение Kd_{2A} оказывается несколько больше значения Kd_2 для R_AC WT комплекса, что невозможно, так как комплекс $R_{AB}C$ WT хоть незначительно, но крепче комплекса R_AC WT. В то же время взятое нами среднее значение Kd_4 получено всего на двух измерениях (1,0·10^{-10} М и 1,9·10^{-10} М) и поэтому его достоверность можно поставить под сомнение. В этой связи вполне приемлемым представляется использование вместо конкретного среднего значения Kd_4 диапазона, определяемого данными двух предпринятых измерений, и вариация значения Kd_4 в рамках этого диапазона. Целью вариации является определение максимального значения Kd_4, при котором значения других констант не противоречат друг другу.

В таблице Б.2 суммированы все полученные оценки.

1) $Kd_4 = 1{,}25 \cdot 10^{-10} M$. При всех ранее принятых оценках, такое значение Kd_4 является максимальным, при котором значение Kd_{2A} оказывается меньше значения Kd_2 для R_AC WT.
2) $K_{акт}$ = 9,8·10^{-8} М, при условиях что $[C]_{tot}$ = 2,5·10^{-8} М, [S] = 1,0·10^{-4}М, K_m = 1,6·10^{-5}М. Такая оценка хорошо согласуется с экспериментальными данными (таблица 1.2).
3) $Kd_{1A}^{B} = 2{,}4 \cdot 10^{-6} M$. Экспериментальных оценок этой константы не существует, но данное значение представляется правдоподобным, так как выполняется неравенство $Kd_{1A}^{B} < Kd_{1A}$. Это неравенство отражает экспериментально обнаруженную [72] положительную кооперативность между A- и B-сайтами в $R_{AB}C$ WT комплексе.
4) $Kd_{1B}^{A} = 3{,}5 \cdot 10^{-8} M$. Экспериментальных оценок этой константы, не существует, но полученное значение представляется правдоподобным, так как выполняется неравенство $Kd_{1B}^{A} < Kd_{1B}$. Это неравенство отражает экспериментально обнаруженную [72] положительную кооперативность между A- и B-сайтами в $R_{AB}C$ WT комплексе.

5) $Kd_{3B}^{A} = 9{,}2 \cdot 10^{-9} M$. Экспериментальных оценок этой константы, не существует, но полученное значение представляется правдоподобным, так как выполняется неравенство $Kd_{3B}^{A} \le Kd_{3B}$. Выполнение этого неравенства согласуется с экспериментально измеренным значением коэффициента Хилла (h = 1) для свободной регуляторной субъединицы RIα с делецией Δ(1–91) [79].

6) $Kd_{2A} = 6{,}5 \cdot 10^{-8} M$. Экспериментальных оценок этой константы, не существует, но данное значение представляется правдоподобным, так как оно больше рассчитанного нами значения Kd_2 для комплекса $R_{AB}C$ R333K ($3{,}1 \cdot 10^{-8}$M) и несколько меньше значения Kd_2 для комплекса R_AC ($6{,}7 \cdot 10^{-8}$M). Согласно данным, полученным методом поверхностного плазмонного резонанса, мутация R333K значительно [76] и присутствие B-домена незначительно [65, 69, 35] повышают стабильность RC комплекса.

7) $Kd_{2B} = 5{,}8 \cdot 10^{-9} M$. Экспериментальных оценок этой константы, не существует, но данное значение представляется правдоподобным, так как оно больше рассчитанного нами значения Kd_2 для комплекса $R_{AB}C$ R209K ($1{,}9 \cdot 10^{-9}$M). Согласно данным, полученным методом поверхностного плазмонного резонанса, мутация R209K значительно повышает стабильность RC комплекса [69].

8) Наши приближенные оценки истинных констант связывания цАМФ с R-субъединицей и RC комплексом дали следующие значения: $Kd_R \approx 2{,}7 \cdot 10^{-8}$M, $Kd_{RC} \approx 1{,}2 \cdot 10^{-6}$M. При этом значение Kd_R находится в хорошем соответствии с экспериментальными данными (таблица 1.1), а значение Kd_{RC} более чем в 2 раза меньше экспериментально измеренного (таблица 1.1). Тем не менее вследствие приведенных в разделе Б.2.1 причин, мы не будем придавать этим оценкам большого значения.

Таблица Б.2 – Значения констант, характеризующих активацию ПКА Iα с двумя доступными для лиганда сайтами связывания

Константа	Значение, М	Источник значения константы
Kd_R	$\approx 2{,}7 \cdot 10^{-8}$	Оценена в разделе Б.2
Kd_{RC}	$\approx 1{,}2 \cdot 10^{-6}$	Оценена в разделе Б.2
Kd_{1A}	$4{,}0 \cdot 10^{-5}$	Оценена в разделе Б.1.9.1
Kd^{B}_{1A}	$2{,}4 \cdot 10^{-6}$	Оценена в разделе Б.2
Kd_{1B}	$6{,}0 \cdot 10^{-7}$	Эксперимент (таблица 1.1)
Kd^{A}_{1B}	$3{,}5 \cdot 10^{-8}$	Оценена в разделе Б.2
Kd_2	$2{,}5 \cdot 10^{-7}$	Эксперимент (таблица 1.1)
Kd_{2A}	$6{,}5 \cdot 10^{-8}$	Оценена в разделе Б.2
Kd_{2B}	$5{,}8 \cdot 10^{-9}$	Оценена в разделе Б.2
Kd_{3A}	$7{,}8 \cdot 10^{-8}$	Оценена в разделе Б.1.9.3
Kd^{B}_{3A}	$5{,}6 \cdot 10^{-8}$	Эксперимент (таблица1.1)
Kd_{3B}	$1{,}3 \cdot 10^{-8}$	Оценена в разделе Б.1.9.4
Kd^{A}_{3B}	$9{,}2 \cdot 10^{-9}$	Оценена в разделе Б.2
Kd_4	$1{,}25 \cdot 10^{-10}$	Оценена в разделе Б.2
$K_{акт}/[C]_{tot}$	$9{,}8 \cdot 10^{-8}/2{,}5 \cdot 10^{-8}$	Оценена в разделе Б.2

ПРИЛОЖЕНИЕ В

В приложении В представлены результаты факторного и кросскорреляционного анализов, полученные для конформационного (Н→В) перехода А-домена ПКА Iα в соответствии с методикой, изложенной в разделе 3.4.3. На рисунках В.1 – В.12 приведены данные для домена дикого типа (опыты 1 – 12), а на рисунке В.13 – для домена с точечной заменой R209K.

Таблицы для всех опытов построены по единому принципу. В столбцах приведены факторы, описывающие основные конформационные изменения белка, в порядке следования во времени соответствующих им стадий. В строках даны параметры, на совокупности которых делался факторный анализ (о выборе параметров в разделе 2.4.3). Вклады параметров в факторы выделены жирным шрифтом, если соответствующие изменения значений параметров не являются случайными и по модулю таковы, что ими нельзя пренебречь. Вклады, меньшие чем 0,35, в таблице не приведены. Названия и вклады параметров, значения которых при переходе в В-конформацию уменьшаются, выделены синим цветом, а значения которых увеличиваются – красным. Единственный параметр, значения которого в ходе конформационного перехода сначала уменьшаются, а потом увеличиваются – расстояние, характеризующее водородную связь между амидной группой R230 и карбонильной группой G235. Название этого параметра выделено лиловым цветом, а вклады синим и красным в соответствии с принятыми нами обозначениями.

Цветными блоками показаны события, совокупность которых и описывает переход домена из Н- в В-конформацию. Каждое событие независимо от опыта характеризуется относительно постоянным набором параметров, вносящих вклады в него, с фиксированным для каждого параметра знаком. При этом одни и те же параметры на разных стадиях конформационного перехода могут вносить вклад в разные события, а один фактор может быть образован более чем одним событием. Голубым цветом отмечено событие А, строго говоря, не имеющее отношения к переходу домена в В-конформацию. Это восстановление водородных связей спирали ФСК после устранения деформирующего влияния С-субъединицы. Серым цветом выделено событие Б – переход ФСК из Н- в В-конформацию, включая «упаковывание» боковой цепи L203 в гидрофобный карман (процессы, подробно описанные в главах 5 и 6). Сиреневым цветом показано движение N3A-мотива в сторону от ФСК (событие В), а желтым цветом – поворот B/C-спирали (событие Г). Элементом гидрофобного переключателя является образование взаимодействия между Y229 и β-субдоменом. Соответствующее этому процессу событие Д отмечено розовым цветом. Зеленым цветом показан продемонстрированный нами переход фрагмента B/C-спирали из α- в π-форму и сопутствующее ему увеличение энергии

взаимодействия B/C-спирали с ФСК и N3A-мотивом (событие Е). π-спирали в белках являются переходными недолговечными структурами. Событие И, заключающееся в образовании излома B/C-спирали на месте фрагмента π-спирали, а также в фиксации этого излома электростатическим взаимодействием R241–E200 и в меньшей степени вандерваальсовым взаимодействием L238–I204, обозначено темно-бирюзовым цветом.

Этапы[34]	**1**		**2**
№ фактора	**2**	**1**	**1**
L201(O)–Y205(N)			
L201(N)–цАМФ	**0,804**	0,438	
A202(N)–цАМФ	**0,855**		
G199(O)–A202(N)	**-0,73**	-0,437	
E200(O)–I204(N)	**0,84**		
A202(O)–T207(N)	**0,703**	0,359	
G169(N)–G206(O)	**-0,791**	-0,429	0,439
G169(N)–T207(O)	**-0,742**		
E (L203/G169,D170,N171)	**0,767**	0,431	
E (Y229/F172,E200,L203,I204)		**0,829**	
E (L203,I204/L135,F136)		**-0,862**	-0,682
L135(Cα)–I204(Cα)		**-0,852**	0,803
E (Y229/L135,F136)		**-0,614**	
Y229(O)–M234(N)		**0,928**	-0,414
R230(O)–M234(N)		**-0,848**	
R230(O)–G235(N)		**0,869**	**-0,775**
R231(O)–G235(N)		**-0,694**	**-0,861**
E (L233/L135,F136,L139)		**0,866**	
E (M234/I204)		**0,861**	
R231(O)–S236(N)		0,607	**-0,913**
I232(O)–S236(N)			**-0,916**
E (R241/E200)			**0,937**
E (L238/I204)		0,62	**0,762**
$RMSD_B$(ФСК)	**0,874**	0,398	
$RMSD_B$(B/C-h)	**0,422**	**0,87**	**0,846**
$RMSD_B$(N3A)		**0,919**	0,714
% вариации	**25,23**	**39,61**	**28,98**
Σ% вариации	**64,84**		**28,98**

Рисунок В.1 – А-домен дикого типа (опыт 1)

[34] Разделение процесса конформационного перехода на этапы здесь и далее (на рисунках в приложении Г) является техническим приемом (подробнее раздел 2.4.3) и для каждого опыта различно.

Этапы	1		2	
№ фактора	1	2	2	1
L201(O)–Y205(N)	0,526			
L201(N)–цАМФ	0,734	0,36		
A202(N)–цАМФ	0,728			
G199(O)–A202(N)	-0,68			
E200(O)–I204(N)	0,657			
A202(O)–T207(N)	0,725			
G169(N)–G206(O)	-0,6	-0,412		
G169(N)–T207(O)	-0,606	-0,409		
E (L203/G169,D170,N171)	0,592	0,569		
E (Y229/F172,E200,L203,I204)		0,721	0,517	0,427
E (L203,I204/L135,F136)	-0,755	-0,464		
L135(Cα)–I204(Cα)	-0,691	-0,533		
E (Y229/L135,F136)	-0,81			-0,372
Y229(O)–M234(N)		0,848		
R230(O)–M234(N)			-0,639	-0,489
R230(O)–G235(N)	0,352	0,84		-0,933
R231(O)–G235(N)				-0,926
E (L233/L135,F136,L139)		0,868	0,77	
E (M234/I204)		0,77		
R231(O)–S236(N)				-0,942
I232(O)–S236(N)				-0,91
E (R241/E200)				0,953
E (L238/I204)				0,856
$RMSD_B$(ФСК)	0,784	0,398		
$RMSD_B$(B/C-h)	0,685	0,531	0,397	0,833
$RMSD_B$(N3A)	0,686	0,525		
% вариации	31,61	23,09	6,44	25,36
Σ% вариации	54,70		31,80	

Рисунок В.2 – А-домен дикого типа (опыт 2)

Этапы	1		2		3
№ фактора	1	2	2	1	1
L201(O)–Y205(N)	0,354	0,726			
L201(N)–цАМФ	0,812				
A202(N)–цАМФ	0,678				
G199(O)–A202(N)	-0,682		-0,566		
E200(O)–I204(N)	0,371	0,689			
A202(O)–T207(N)			0,356		
G169(N)–G206(O)	-0,667		-0,665		
G169(N)–T207(O)	-0,634				
E (L203/G169,D170,N171)	0,567	0,485	0,641		
E (Y229/F172,E200,L203,I204)	-0,492			0,682	
E (L203,I204/L135,F136)		0,798		-0,666	
L135(Cα)–I204(Cα)		0,836		-0,936	
E (Y229/L135,F136)				-0,809	
Y229(O)–M234(N)				0,954	-0,386
R230(O)–M234(N)				-0,869	
R230(O)–G235(N)				0,898	-0,895
R231(O)–G235(N)				-0,882	-0,903
E (L233/L135,F136,L139)				0,802	
E (M234/I204)				0,944	
R231(O)–S236(N)					-0,959
I232(O)–S236(N)					-0,901
E (R241/E200)					0,883
E (L238/I204)				0,696	0,863
$RMSD_B$(ФСК)	0,729	0,439	0,45		
$RMSD_B$(B/C-h)				0,909	0,708
$RMSD_B$(N3A)				0,895	
% вариации	17,25	13,22	6,92	37,09	22,33
Σ% вариации	30,47		44,01		22,33

Рисунок В.3 – А-домен дикого типа (опыт 3)

Этапы	1		2	3
№ фактора	1	2	1	1
L201(O)–Y205(N)		0,921		
L201(N)–цАМФ	0,878			0,421
A202(N)–цАМФ	0,791			
G199(O)–A202(N)	-0,752			
E200(O)–I204(N)	0,575	0,716		
A202(O)–T207(N)	0,652			
G169(N)–G206(O)	-0,731	-0,455		
G169(N)–T207(O)	-0,813	-0,369		
E (L203/G169,D170,N171)	0,719	0,355		
E (Y229/F172,E200,L203,I204)	-0,676		0,756	
E (L203,I204/L135,F136)		-0,577	-0,71	
L135(Cα)–I204(Cα)		-0,716	-0,718	-0,415
E (Y229/L135,F136)			-0,776	0,725
Y229(O)–M234(N)			0,928	
R230(O)–M234(N)			-0,808	
R230(O)–G235(N)			0,833	-0,924
R231(O)–G235(N)			-0,843	-0,915
E (L233/L135,F136,L139)	-0,417		0,869	-0,463
E (M234/I204)	-0,515		0,834	
R231(O)–S236(N)				-0,949
I232(O)–S236(N)				-0,909
E (R241/E200)				0,949
E (L238/I204)			0,49	0,839
$RMSD_B$(ФСК)	0,825	0,473		
$RMSD_B$(B/C-h)	0,37	0,502	0,929	0,895
$RMSD_B$(N3A)		0,797		0,625
% вариации	26,73	16,84	29,82	29,19
Σ% вариации	43,57		29,82	29,19

Рисунок В.4 – А-домен дикого типа (опыт 4)

Этапы	1		2		3
№ фактора	5	1	2	1	1
L201(O)–Y205(N)	0,658				
L201(N)–цАМФ		0,853	0,658	0,381	
A202(N)–цАМФ		0,864			
G199(O)–A202(N)		-0,816	-0,587		
E200(O)–I204(N)		0,765			
A202(O)–T207(N)		0,81			
G169(N)–G206(O)		-0,897	-0,55		
G169(N)–T207(O)		-0,726			
E (L203/G169,D170,N171)		0,892			
E (Y229/F172,E200,L203,I204)		-0,725	0,599	0,616	
E (L203,I204/L135,F136)			-0,873		-0,411
L135(Cα)–I204(Cα)			-0,862		
E (Y229/L135,F136)	-0,759			-0,646	
Y229(O)–M234(N)		-0,364		0,897	-0,36
R230(O)–M234(N)				-0,861	
R230(O)–G235(N)				0,86	-0,944
R231(O)–G235(N)				-0,758	-0,941
E (L233/L135,F136,L139)	-0,626			0,792	
E (M234/I204)		-0,41		0,831	
R231(O)–S236(N)				0,368	-0,957
I232(O)–S236(N)					-0,913
E (R241/E200)				0,367	0,929
E (L238/I204)				0,638	0,808
$RMSD_B$(ФСК)		0,958			
$RMSD_B$(B/C-h)		0,411	0,787	0,485	0,915
$RMSD_B$(N3A)			0,874		
% вариации	6,89	31,80	19,47	24,48	24,75
Σ% вариации	38,69		43,95		24,75

Рисунок В.5 – А-домен дикого типа (опыт 5)

Этапы	1			2		3
№ фактора	4	5	1	2	1	1
L201(O)–Y205(N)	0,857					
L201(N)–цАМФ			0,875	0,577		
A202(N)–цАМФ			0,902			
G199(O)–A202(N)			-0,857	-0,438		
E200(O)–I204(N)	0,495		0,676			
A202(O)–T207(N)		0,431	0,678			
G169(N)–G206(O)			-0,92	-0,442		
G169(N)–T207(O)			-0,806			
E (L203/G169,D170,N171)			0,914			0,419
E (Y229/F172,E200,L203,I204)	-0,402	-0,481		0,781		
E (L203,I204/L135,F136)				-0,902		0,452
L135(Cα)–I204(Cα)			0,631	-0,898		0,571
E (Y229/L135,F136)				-0,395		
Y229(O)–M234(N)					0,917	
R230(O)–M234(N)					-0,835	-0,504
R230(O)–G235(N)					0,87	-0,961
R231(O)–G235(N)					-0,813	-0,955
E (L233/L135,F136,L139)		0,7			0,817	
E (M234/I204)	-0,54			0,358	0,855	
R231(O)–S236(N)						-0,96
I232(O)–S236(N)						-0,903
E (R241/E200)					0,75	0,892
E (L238/I204)					0,696	0,558
$RMSD_B$(ФСК)			0,954			
$RMSD_B$(B/C-h)		-0,356	0,75	0,803	0,538	0,933
$RMSD_B$(N3A)			-0,591	0,875		0,437
% вариации	7,22	5,93	33,42	20,06	24,62	26,51
Σ% вариации	46,57			44,68		26,51

Рисунок В.6 – А-домен дикого типа (опыт 6)

Этапы	1			2		3	4
№ фактора	5	1	2	1	2	1	2
L201(O)–Y205(N)	0,717				-0,37		
L201(N)–цАМФ		0,822					-0,68
A202(N)–цАМФ		0,795					
G199(O)–A202(N)		-0,749					
E200(O)–I204(N)	0,411	0,596					
A202(O)–T207(N)		0,774			0,614		
G169(N)–G206(O)		-0,865			-0,432		
G169(N)–T207(O)		-0,794					
E (L203/G169,D170,N171)		0,837					
E (Y229/F172,E200,L203,I204)			0,684				
E (L203,I204/L135,F136)			-0,814		-0,841		
L135(Cα)–I204(Cα)			-0,755		-0,887		
E (Y229/L135,F136)	-0,58			-0,378	-0,488	-0,501	
Y229(O)–M234(N)				0,809	0,368	-0,351	
R230(O)–M234(N)				-0,659	-0,378		
R230(O)–G235(N)				0,768		-0,956	
R231(O)–G235(N)				-0,69		-0,902	
E (L233/L135,F136,L139)			0,398	0,673			
E (M234/I204)				0,81			
R231(O)–S236(N)						-0,953	
I232(O)–S236(N)	0,367		-0,441			-0,841	-0,56
E (R241/E200)						0,894	-0,79
E (L238/I204)				0,718			0,833
$RMSD_B$(ФСК)		0,925		-0,516			
$RMSD_B$(B/C-h)		0,567	0,659		0,757	0,922	
$RMSD_B$(N3A)			0,585	0,359	0,863	0,368	
% вариации	6,23	26,85	12,68	18,32	17,25	23,00	9,63
Σ% вариации	45,76			35,57		23,00	9,63

Рисунок В.7 – А-домен дикого типа (опыт 7)

Этапы	1		2		3	
№ фактора	2	1	2	1	2	1
L201(O)–Y205(N)	0,766					
L201(N)–цАМФ		0,874	0,386	0,638		
A202(N)–цАМФ		0,776				
G199(O)–A202(N)		-0,819				
E200(O)–I204(N)	0,639	0,458				
A202(O)–T207(N)		0,771				
G169(N)–G206(O)		-0,867				
G169(N)–T207(O)		-0,834				
E (L203/G169,D170,N171)		0,825				
E (Y229/F172,E200,L203,I204)		-0,759	0,816		0,729	
E (L203,I204/L135,F136)			-0,904			-0,404
L135(Cα)–I204(Cα)		0,543	-0,935		-0,358	-0,57
E (Y229/L135,F136)	-0,665		-0,872		-0,735	
Y229(O)–M234(N)				0,897		
R230(O)–M234(N)				-0,827		-0,409
R230(O)–G235(N)			0,385	0,775		-0,908
R231(O)–G235(N)				-0,791		-0,9
E (L233/L135,F136,L139)	-0,51	0,586		0,893		
E (M234/I204)	-0,587		0,375	0,812		
R231(O)–S236(N)						-0,939
I232(O)–S236(N)						-0,809
E (R241/E200)						0,903
E (L238/I204)				0,716		0,727
$RMSD_B$(ФСК)		0,928				
$RMSD_B$(B/C-h)		0,846	0,832	0,414		0,872
$RMSD_B$(N3A)		-0,745	0,808	0,493	0,418	
% вариации	9,95	36,82	20,95	23,33	6,87	24,39
Σ% вариации	46,77		44,28		31,26	

Рисунок В.8 – А-домен дикого типа (опыт 8)

Этапы	1			2	3	4
№ фактора	6	1	2	1	1	1
L201(O)–Y205(N)	0,957					
L201(N)–цАМФ		0,915				
A202(N)–цАМФ		0,892				
G199(O)–A202(N)		-0,885				
E200(O)–I204(N)		0,706			0,362	
A202(O)–T207(N)		0,894				
G169(N)–G206(O)		-0,927				
G169(N)–T207(O)		-0,879				
E (L203/G169,D170,N171)		0,929				
E (Y229/F172,E200,L203,I204)			0,853			
E (L203,I204/L135,F136)		-0,725			-0,825	-0,396
L135(Cα)–I204(Cα)		-0,403			-0,897	-0,607
E (Y229/L135,F136)				-0,463		
Y229(O)–M234(N)				0,894	0,713	
R230(O)–M234(N)				-0,724	-0,519	-0,723
R230(O)–G235(N)				0,825		-0,969
R231(O)–G235(N)				-0,788	-0,49	-0,933
E (L233/L135,F136,L139)		0,644	0,36	0,718	-0,506	-0,466
E (M234/I204)			0,707	0,77		
R231(O)–S236(N)					-0,428	-0,965
I232(O)–S236(N)		-0,407				-0,876
E (R241/E200)					0,502	0,696
E (L238/I204)				0,618		0,5
$RMSD_B$(ФСК)		0,964				
$RMSD_B$(B/C-h)		0,737	0,48	0,561	0,721	0,812
$RMSD_B$(N3A)		0,542		0,59	0,875	
% вариации	4,57	39,45	8,20	20,51	19,31	24,42
Σ% вариации	52,22			20,51	19,31	24,42

Рисунок В.9 – А-домен дикого типа (опыт 9)

Этапы	1				2		3
№ фактора	6	1	5	2	1	2	1
L201(O)–Y205(N)	0,932						
L201(N)–цАМФ		0,88			0,448		
A202(N)–цАМФ		0,895					
G199(O)–A202(N)		-0,863					
E200(O)–I204(N)	0,515	0,69					
A202(O)–T207(N)		0,837					
G169(N)–G206(O)		-0,876					
G169(N)–T207(O)		-0,867					
E (L203/G169,D170,N171)		0,907					
E (Y229/F172,E200,L203,I204)			0,506	0,5		0,518	
E (L203,I204/L135,F136)		-0,761		-0,457			
L135(Cα)–I204(Cα)		-0,513		-0,748	-0,405	-0,704	
E (Y229/L135,F136)	-0,36			-0,613	-0,519		
Y229(O)–M234(N)					0,907		-0,417
R230(O)–M234(N)					-0,829		
R230(O)–G235(N)					0,813		-0,928
R231(O)–G235(N)					-0,837		-0,943
E (L233/L135,F136,L139)		0,513	0,721		0,849		
E (M234/I204)			0,389	0,585	0,823		
R231(O)–S236(N)							-0,963
I232(O)–S236(N)			-0,607				-0,94
E (R241/E200)					0,355	0,705	0,93
E (L238/I204)				-0,643	0,73		0,622
$RMSD_B$(ФСК)		0,929					
$RMSD_B$(B/C-h)		0,741		0,538	0,604	0,605	0,939
$RMSD_B$(N3A)		0,546		0,649	0,43	0,458	
% вариации	6,30	34,70	6,31	12,92	25,21	8,67	24,66
Σ% вариации	60,23				33,88		24,66

Рисунок В.10 – А-домен дикого типа (опыт 10)

Этапы	1[35]				2		3	
№ фактора	5	1	2	6	1	3	1	2
L201(O)–Y205(N)	0,909							
L201(N)–цАМФ		0,841						-0,373
A202(N)–цАМФ		0,853						
G199(O)–A202(N)		-0,833						
E200(O)–I204(N)	0,667	0,583						
A202(O)–T207(N)		0,564						
G169(N)–G206(O)		-0,855						
G169(N)–T207(O)		-0,689						
E (L203/G169,D170,N171)		0,859						0,571
E (Y229/F172,E200,L203,I204)				0,849		0,449		
E (L203,I204/L135,F136)			-0,86		-0,37	-0,746		0,433
L135(Cα)–I204(Cα)			-0,866		-0,409	-0,728		
E (Y229/L135,F136)						-0,544		
Y229(O)–M234(N)					0,912			
R230(O)–M234(N)					-0,74			
R230(O)–G235(N)					0,614		-0,902	
R231(O)–G235(N)					-0,424		-0,858	
E (L233/L135,F136,L139)					0,762			
E (M234/I204)					0,781			
R231(O)–S236(N)							-0,914	
I232(O)–S236(N)							-0,747	
E (R241/E200)							0,841	
E (L238/I204)				0,608			0,35	0,429
$RMSD_B$(ФСК)		0,912						
$RMSD_B$(B/C-h)		0,537		0,574	0,674		0,516	
$RMSD_B$(N3A)			0,813		0,812			0,714
% вариации	6,81	22,88	9,43	6,71	19,10	7,30	16,90	7,01
∑% вариации	45,83				26,40		23,91	

Рисунок В.11 – А-домен дикого типа (опыт 11)

[35] Порядок следования стадий на первом этапе опыта 11 определен визуально, так как из-за колебаний значений параметров кросскорреляционный анализ давал неудовлетворительные результаты

Этапы	1			2		3		4	5
№ фактора	2	1	5	2	1	2	1	1	1
L201(O)–Y205(N)	0,849								
L201(N)–цАМФ		0,909		0,735					
A202(N)–цАМФ		0,897							
G199(O)–A202(N)		-0,868		-0,788					
E200(O)–I204(N)	0,555	0,663							
A202(O)–T207(N)		0,896							
G169(N)–G206(O)		-0,9		-0,526					
G169(N)–T207(O)		-0,866							
E (L203 /G169,D170,N171)		0,896			0,378				
E (Y229/F172, E200,L203,I204)		-0,816			0,66	0,42	0,654	-0,421	0,383
E (L203,I204 /L135,F136)			0,866			-0,733	-0,352	-0,699	
L135(Cα)–I204(Cα)		0,748	0,48			-0,701	-0,489	-0,882	-0,514
E (Y229 /L135,F136)	-0,406	0,416	0,545		-0,692				
Y229(O)–M234(N)					0,939		-0,781	0,787	-0,52
R230(O)–M234(N)					-0,853		0,884	-0,669	
R230(O)–G235(N)					0,797		0,774		-0,921
R231(O)–G235(N)					-0,728				-0,88
E (L233 /L135,F136,L139)		0,474	0,536		0,839			0,482	-0,626
E (M234/I204)	-0,783	-0,39			0,731	0,765			
R231(O)–S236(N)							0,558		-0,953
I232(O)–S236(N)								0,407	-0,898
E (R241/E200)									0,904
E (L238/I204)									
$RMSD_B$(ФСК)		0,928						0,361	
$RMSD_B$(B/C-h)		0,684			0,847	0,731		0,713	0,861
$RMSD_B$(N3A)		-0,637	-0,481			0,574		0,851	0,641
% вариации	9,77	40,48	8,26	8,04	25,01	11,93	13,91	18,94	25,92
Σ% вариации	58,51			33,05		25,84		18,94	25,92

Рисунок В.12 – А-домен дикого типа (опыт 12)[36]

[36] В ходе данного опыта событие Е происходит раньше событий В и Д. Затем оно частично отменяется, что показано на рисунке диагональной штриховкой соответствующего события слева направо снизу вверх, а потом опять восстанавливается.

Этапы	1			2	3	4	
№ фактора	5	1	2	1	1	2	1
L201(O)–Y205(N)	0,773						
L201(N)–цАМФ		0,869					0,418
A202(N)–цАМФ		0,794					
G199(O)-A202(N)		-0,804					
E200(O)–I204(N)	0,416	0,765					
A202(O)–T207(N)		0,798					
G169(N)–G206(O)		-0,875					
G169(N)–T207(O)		-0,865					
E (L203/G169,D170,N171)		0,859		0,45			
E (Y229/F172,E200,L203,I204)		-0,786		0,828			
E (L203,I204/L135,F136)			0,758	-0,895		-0,826	
L135(Cα)–I204(Cα)		0,442	0,747	-0,951		-0,563	-0,699
E (Y229/L135,F136)			0,701	-0,781		-0,621	-0,364
Y229(O)–M234(N)	0,672				0,96		
R230(O)–M234(N)					-0,785		-0,425
R230(O)–G235(N)				0,433	0,872		-0,942
R231(O)–G235(N)					-0,877		-0,883
E (L233/L135,F136,L139)		0,506	0,649		0,837		-0,399
E (M234/I204)		-0,366		0,508	0,883		
R231(O)–S236(N)							-0,902
I232(O)–S236(N)							-0,803
E (R241/E200)							0,94
E (L238/I204)							0,795
$RMSD_B$(ФСК)		0,945					
$RMSD_B$(B/C-h)		0,702	0,399	0,511	0,939		0,896
$RMSD_B$(N3A)		-0,387	-0,751	0,942		0,643	
% вариации	6,05	35,44	14,12	20,97	23,67	8,38	26,47
Σ % вариации	55,61			20,97	23,67	34,85	

Рисунок В.13 – А-домен с точечной заменой R209K