

ПРИРОДА МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ, ВЛИЯЮЩИХ НА ОЛИГОМЕРИЗАЦИЮ НИКАЗЫ Nt.BspD6I

© 2024 г. В.Н. Антипова*, А.К. Юнусова*, Р.И. Артюх*.*#

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: rimmaartyukh@gmail.com

Поступила в редакцию 26.02.2024 г.

После доработки 08.07.2024 г.

Принята к публикации 17.07.2024 г.

Знание природы межмолекулярных взаимодействий и аминокислотных остатков, их обеспечивающих, дает возможность целенаправленно менять устойчивость межмолекулярных комплексов. В данной работе на примере никазы Nt.BspD6I продемонстрировано влияние гидрофобных взаимодействий на способность белка к олигомеризации и необходимость химической и геометрической комплементарности интерфейсных поверхностей при образовании устойчивых гомокомплексов.

Ключевые слова: межмолекулярные взаимодействия, никаза Nt.BspD6I, гидрофобные поверхности, олигомеризация, гомодимеры.

DOI: 10.31857/S0006302924040023, EDN: NINNHO

В основе механизма объединения субъединиц в единую функциональную структуру лежат принципы молекулярного распознавания. Физик Г.Р. Крейн (H.R. Crane) сформулировал два принципа межмолекулярного узнавания еще до открытия атомной структуры первых биомолекул [1]. Согласно этим принципам, биомолекулы взаимодействуют через интерфейсные поверхности, обеспечивающие связь с необходимым субстратом, формируя множество слабых взаимодействий, таких как образование водородной связи, электростатические и гидрофобные взаимодействия. Образующиеся комплексы могут существовать долгое время, если интерфейсные поверхности имеют геометрическое соответствие и комплементарность химических групп [2, 3]. Если эти принципы нарушаются, то образующийся комплекс будет слабым и сможет существовать непродолжительное время.

Эти же принципы обеспечивают прочность и гомокомплексов. Стереохимическое соответствие является одним из ключевых параметров для белок-белковых взаимодействий [4, 5]. Даже при отсутствии электростатической и гидрофобной комплементарности белки, имеющие геометрическую комплементарность, могут образовывать комплексы [6].

Сокращение: а.о. — аминокислотные остатки.

На процесс образования гомокомплексов белка могут оказывать влияние и мутации определенных аминокислотных остатков в молекуле белка. Например, точечная мутация в положении Glu6 в b-цепи гемоглобина A на Val6 в гемоглобине S способствует его агрегации и приводит к серповидно-клеточной анемии [7]. Поэтому исследование влияния определенных остатков на процесс олигомеризации является актуальной задачей.

В данном сообщении представлены сведения о влиянии цистеинов на процесс олигомеризации никующей эндонуклеазы Nt.BspD6I (никазы). Цистеиновые остатки в белковых молекулах составляют не более 1.9% от общего содержания аминокислотных остатков (а.о.). Однако в результате высокой реакционной способности тиольных групп цистеинов эти остатки часто входят в состав активных центров ферментов.

Объектами исследования в работе, представленной в этой статье, является никаза Nt.BspD6I, которая была найдена в термофильном штамме *Bacillus species* D6 [8], и ее мутантные формы, полученные методом сайт-направленного мутагенеза. Согласно кристаллическим структурам никазы дикого типа [9], Cys-free-никазы [10] и S11C Cys-free-никазы [11], установленным методом рентгеноструктурного анализа с высоким разрешением (1.8–1.9 Å), в молекуле никазы присутствуют четыре цистеиновых остатка (Cys11,

Cys160, Cys508 и Cys578), которые не образуют дисульфидные связи и не входят в активный центр никазы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Методика выделения и очистки никазы дикого типа и ее мутантных форм детально представлена в работах [10–12]. Основные этапы методики представлены ниже.

Образцы никаза нарабатывали в экспрессионном штамме *E. coli* BL21(DE3)/pRARE-M.SscL11, содержащем ДНК-метилтрансферазу, которая защищает ДНК от гидролиза никазой. Биомассу выращивали в среде LB, содержащей 40 мкг/мл канамицина и 10 мкг/мл хлорамфеникола в течение 3 ч при 37°C до оптической плотности $A_{\lambda 590} = 0.6$ О.Е. Потом культуру охлаждали до 20°C. Индукцию проводили добавлением ИПТГ до концентрации 1 мМ. Биомассу нарабатывали при 20°C в течение ночи до поздней логарифмической фазы при интенсивной аэрации и осаждали центрифугированием при 18000 g, 30 мин при 4°C (центрифуга CR 22GIII, Hitachi, Япония). Осадок ресуспендировали при 4°C в буфере (0.02 М К-фосфатный буфер, pH 7.5, 7 мМ β -меркаптоэтанола, 1 мМ ЭДТА), содержащем 1 мМ фенилметилсульфонилфторида. Клетки разрушали ультразвуком до снижения оптической плотности в 10 раз при помощи дезинтегратора УЗД-1 У4.2 (СССР) и центрифугировали (18000 g, 30 мин, 4°C). Полученный лизат очищали в два этапа при помощи колоночной хроматографии низкого давления с использованием прибора Bio-Logic LP System (Bio-Rad, США). Сначала использовали афинную хроматографию на Ni-NTA-agarose (QIAGEN, Германия), а потом фракции, содержащие никазу, наносили на колонку с фосфоцеллюлозой P11 (Whatman, США). Фракции с максимальной концентрацией никазы переводили в буфер для хранения (10 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 150 мМ KCl, 0.1 мМ ЭДТА, 0.1 мМ дитиотреитол, 50% глицерина (v/v)).

Идентификацию олигомерных форм никазы проводили с помощью электрофореза в нативных условиях [13]. Образцы белка смешивали с загрузочным буфером (10 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 15% глицерина, 1% Кумаси бриллиантового синего G-250) и анализировали в 8%-м полиакриламидном геле (75 : 1), содержащем 200 мМ Трис-НСl (pH 8.8), в течение 40 мин. Катодный буфер содержал 100 мМ гистидина (pH 8.0) и 0.02% Кумаси бриллиантового синего G-250, анодный буфер – 100 мМ Трис-НСl (pH 8.8).

Для поиска участков на поверхности молекулы никазы, склонных к агрегации, был использован Aggrescan3D (A3D) (<https://bitbucket.org/lcbio/aggrescan3d>), автономный мультиплатформенный пакет Python [14]. Это один из хорошо зарекомендовавших себя прогностических инструментов, который позволяет обнаруживать пространственно-соседние аминокислоты, склонные к агрегации [15, 16]. Он может работать как в статическом, так и в динамическом режиме. В качестве входных данных требуется только файл PDB структуры белка.

Aggrescan3D использует экспериментально полученную шкалу внутренней склонности к агрегации для природных аминокислот и проецирует эту шкалу на трехмерную структуру белка. Внутренняя склонность к агрегации каждой конкретной аминокислоты в белке модулируется ее специфическим структурным контекстом. Склонность к агрегации рассчитывается для сферических областей с центром на каждом остатке углерода C α . Это обеспечивает уникальное структурно скорректированное значение агрегации (показатель A3D, Aggrescan 3D score) для каждой аминокислоты в структуре [16]. По умолчанию для идентификации остатков, участвующих в формировании участков, склонных к агрегации, Aggrescan3D использует радиус сферы 10 Å.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Ранее было показано, что никаза Nt.BspD61 дикого типа (далее wt-никаза) при концентрациях белка ниже 50 мкг/мл существует в форме мономера, а при концентрациях выше 50 мкг/мл образует олигомерные гомокомплексы, преимущественно гомодимеры [17]. Белок-белковые гомокомплексы классифицируют по аффинности на облигатные и не облигатные [18]. Гомокомплексы никазы не являются облигатными, так как при концентрациях ниже 50 мкг/мл молекулы никазы являются стабильными в форме мономера.

Нами показано, что замена всех цистеиновых остатков (11, 160, 508 и 578) на серин в молекуле никазы усиливает ее способность к олигомеризации по сравнению с wt-никазой [10]. Возможной причиной усиления олигомеризации Cys-free-никазы являются конформационные изменения в области N-концевого домена, индуцированные заменой цистеинов. Возвращение Cys11 из Cys-free-никазы наоборот привело к потере способности S11C Cys-free-никазы к олигомеризации [11], что является, вероятно, следствием конформационных изменений в области межмолекулярных контактов, обеспечивающих олигомеризацию молекул никазы.

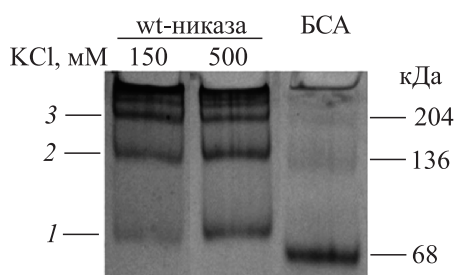


Рис. 1. Олигомерный состав wt-никазы с концентрацией 3 мкМ при разных концентрациях KCl. Цифры слева: 1 – мономер, 2 – димер, 3 – тример; БСА – бычий сывороточный альбумин. Электрофорез проведен в 8 %-м нативном полиакриламидном геле.

Авторы работы [17] на основании электростатического поля молекулы никазы представили модель гомодимера wt-никазы, в которой взаимодействуют положительно заряженная область одной молекулы никазы с отрицательно заряженной областью другой молекулы. Известно, что олигомеры, образующиеся в результате электростатических взаимодействий между субъединицами, при высоких концентрациях соли нестабильны [19, 20]. В данной работе была исследована устойчивость олигомерных комплексов wt-никазы при разных концентрациях соли (рис. 1). Как видно из рис. 1, гомокомплексы никазы стабильны и при высоких концентрациях KCl.

На основании этих данных следует, что в олигомеризацию никазы, кроме электростатических взаимодействий, заметный вклад вносят и гидрофобные взаимодействия, что препятствует разрушению олигомеров никазы в присутствии высоких концентраций соли.

Структуры wt-никазы BspD6I (PDB ID: 2EWF), Cys-free BspD6I (PDB ID: 5LIZ) и S11C Cys-free BspD6I (PDB ID: 5LIQ) никаз были проанализированы в статическом режиме на предмет обнаружения областей, склонных к агрегации, с учетом окружающих а.о. в радиусе 10 Å. Выбор этих структур обусловлен тем, что Cys-free-никаза олигомеризуется значительно сильнее wt-никазы, а S11C Cys-free-никаза не олигомеризуется вовсе. Кроме того, повышенная олигомеризация Cys-free-никазы вызывала заметное снижение ее ферментативной активности по сравнению с никазой дикого типа в два раза, а с S11C Cys-free-никазой – в 16 раз [10, 11]. АЗД-анализ кристаллических структур молекул wt- и мутантных форм никазы в одинаковой ориентации выявил область, склонную к агрегации (рис. 2). Как видно из рис. 2, область, склонная к агрегации, изменяет свою геометрию и размер в зависимости от полного отсутствия цистеинов или возвращения одного из цистеинов (Cys11) в молекуле никазы. Никаза дикого типа демонстрирует среднее положение между Cys-free- и S11C Cys-free-никазами по размеру гидрофобного участка и степени

гидрофобности а.о., ее образующих. Остатки, входящие в область, склонную к агрегации, в Cys-free-никазе имеют ярко красный цвет, что отражает их высокую величину гидрофобности. Этот факт согласуется с ранее установленной нами повышенной олигомеризацией Cys-free-никазы по сравнению с дикой никазой.

В S11C Cys-free-никазе гидрофобный участок в позиции «front» заметно меньший по размеру, чем в Cys-free-никазе. При этом в позиции «back» в S11C Cys-free-никазе отсутствует область, склонная к агрегации. Полученные данные отражают низкую вероятность олигомеризации молекул S11C Cys-free-никазы, что и наблюдалось при исследовании функциональной активности никазы, зависящей от степени ее олигомеризации [11].

В табл. 1 представлены величины оценки гидрофобности/гидрофильности а.о. в области, склонной к агрегации, в структурах молекул исследованных никаз.

В молекуле Cys-free-никазы область, склонная к агрегации, включает шесть гидрофобных а.о. (Leu53, Pro54, Gln55, Phe56, Leu57, Gly 58), принадлежащих L1-петле в N-концевом узнающем домене никазы. Как видно из рис. 2, размер этой области в позициях «front» и «back» достаточно большой и включает те же а.о. и с той же степенью гидрофобности. В случае wt-никазы область, склонная к агрегации, также включает шесть гидрофобных а.о., четыре из которых те же, что и в Cys-free-никазе (Leu53, Phe56, Leu57, Gly 58), но с более низкой величиной оценки гидрофобности. Еще два остатка Ala66 и Phe67 в wt-никазе, входящие в область, склонную к агрегации, отсутствуют в Cys-free-никазе. Остаток Phe67 присутствует в S11C Cys-free-никазе, но его величина гидрофобности почти в четыре раза выше, чем в wt-никазе. Следует отметить, что остатки Pro54 и Gln55 в дикой никазе гидрофильные, а замена всех цистеинов на серин индуцирует конформационные изменения в области этих остатков таким образом, что эти остатки становятся гидрофобными.

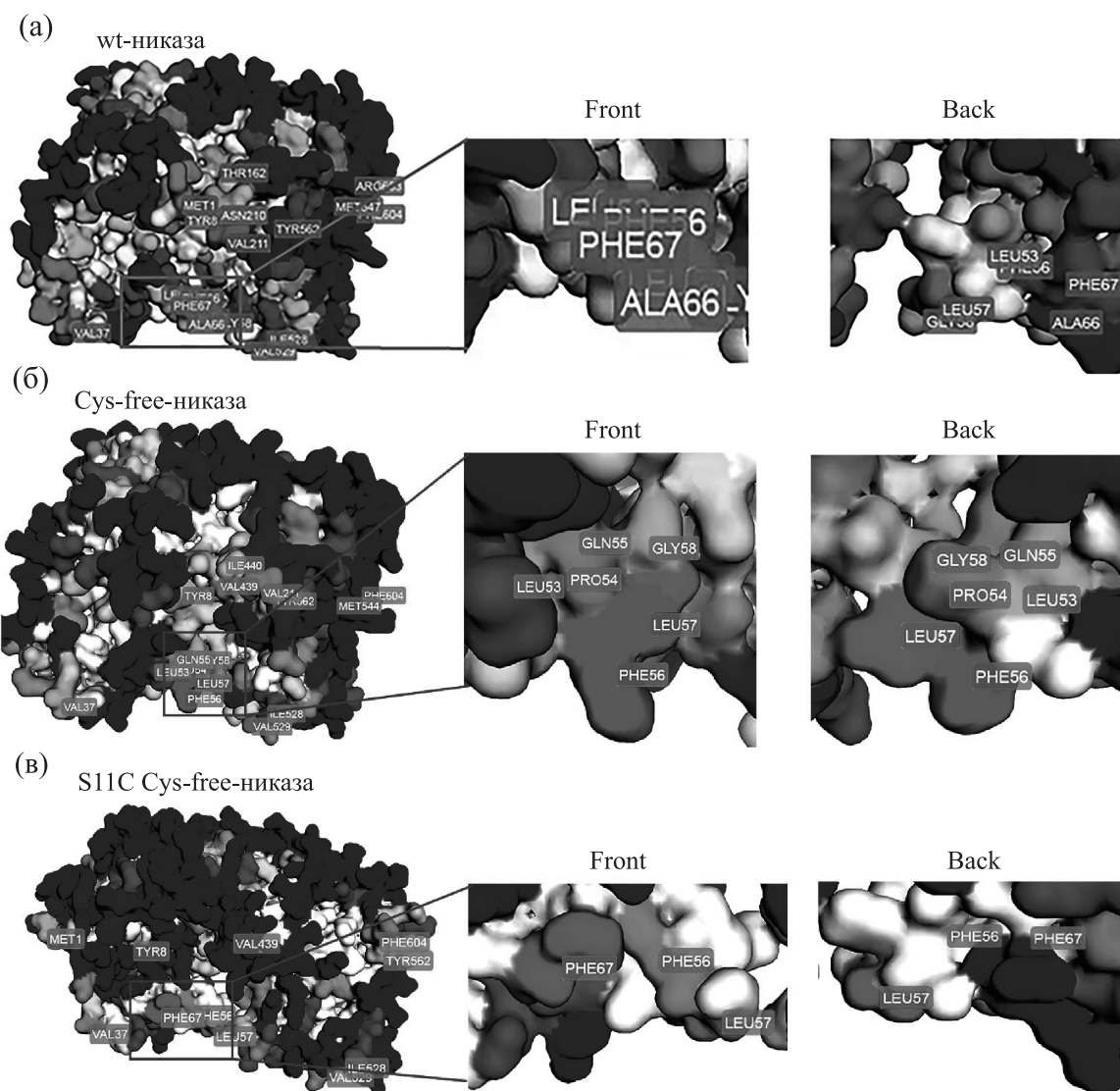


Рис. 2. Визуализация оценки гидрофобности аминокислотных остатков, наложенной на структуру А-цепей wt-, Cys-free- и S11C Cys-free-никаза. «Front» и «back» – область, склонная к агрегации. Остатки, склонные к агрегации (гидрофобные), окрашены в градиенты красного цвета; растворимые остатки (гидрофильные) окрашены в градиенты синего цвета. Чем ярче цвет, тем больше величина оценки гидрофобности/гидрофильности. Белым цветом окрашены остатки, не влияющие на агрегацию и имеющие оценку гидрофобности, равную нулю или около нуля.

В S11C Cys-free-никазе гидрофобный участок включает только три а.о., причем только два из них (Phe56 и Leu57) те же, что и в Cys-free-никазе, а третий (Phe67) отсутствует в ней, но присутствует в никазе дикого типа. Сопоставление величин гидрофобности а.о., представленное в табл. 1, показало, что замена всех цистеинов на серин приводит к повышению гидрофобности всех остатков, образующих область, склонную к олигомеризации никазы. Возвращение одного цистеина (Cys11) сопровождается уменьшением величины гидрофобности Phe56 в 2 раза по сравнению с ве-

личиной гидрофобности этого остатка в Cys-free-никазе. Гидрофобный Gly58 с возвращением Cys11 становится гидрофильным.

Совокупность представленных данных по изучению гидрофобных взаимодействий, а также интерфейсной поверхности взаимодействующих молекул объясняет нестабильность межмолекулярного комплекса S11C Cys-free-никазы. Отсутствие олигомеров в S11C Cys-free-никазе объяснимо снижением числа гидрофобных остатков, способных к агрегации, и величины их гидрофобности (табл. 1).

Таблица 1. Aggrescan 3D score аминокислотных остатков, склонных к агрегации в А-цепях молекул wt-, Cys-free- и S11C Cys-free-никаз

Аминокислотные остатки	wt Nt.BspD6I	Cys-free Nt.BspD6I	S11C Cys-free Nt.BspD6I
Leu 53	0.0963	0.1656	
Pro 54	−0.0105	0.5517	
Gln 55	−0.2087	0.6222	
Phe 56	0.9030	2.0109	0.8854
Leu 57	1.2213	1.2172	1.2298
Gly 58	0.14	0.1685	−0.0226
Ala 66	0.4858		
Phe 67	0.3318		1.2586

ВЫВОДЫ

Представленные результаты исследования позволяют сделать следующие выводы.

1. Гидрофобные взаимодействия обеспечивают устойчивость гомокомплексов никазы.

2. Анализ кристаллических структур никазы дикого типа и ее мутантных форм с использованием Aggrescan3D выявил в молекуле никазы гидрофобную область, склонную к агрегации, в L1 петле N-концевого узнающего домена. Замена всех цистеинов на серин в молекуле никазы увеличивает гидрофобную область, тем самым повышая способность к олигомеризации белка.

3. Установлено, что характер олигомеризации никазы определяется изменением геометрии гидрофобной области, склонной к агрегации. Чем больше гидрофобная область и выше величина гидрофобности аминокислотных остатков, ее образующих, тем выше способность белка к олигомеризации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.б.н. А.В. Русакову и к.б.н. И.Е. Мысину за техническую помощь.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00224-24-01.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Огурцов А. Н. *Введение в биофизику* (НТУ ХПИ, Харьков, 2008).
2. Огурцов А. Н. *Основы молекулярной биологии: в 2-х ч. — Ч. 1. Молекулярная биология клетки* (НТУ ХПИ, Харьков, 2010).
3. Ogurtsov A. N. *Molecular biophysics and enzymatic catalysis* (NTU KhPI, Kharkiv, 2011).
4. Zhang Q., Sanner M., and Olson A. J. Shape complementarity of protein-protein complexes at multiple resolutions. *Prot. Struct. Funct. Bioinform.*, **75**, 453–467 (2009). DOI: 10.1002/prot.22256
5. Santos J., Pujols J., Pallarès I., Iglesias V., and Ventura S. Computational prediction of protein aggregation: Advances in proteomics, conformation-specific algorithms and biotechnological applications. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **18**, 1403–1413 (2020). DOI: 10.1016/j.csbj.2020.05.026
6. Li Y., Zhang X., and Cao D. The role of shape complementarity in the protein-protein interactions. *Sci. Rep.*, **3**, 3–9 (2013). DOI: 10.1038/srep03271
7. Schechter A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*, **112**, (10), 3927–3938 (2008). DOI: 10.1182/blood-2008-04-078188
8. Zheleznyaya L. A., Perevyazova T. A., Alzhanova D. V., and Matvienko N. I. Site-specific nickase from bacillus species strain d6. *Biochemistry (Moscow)*, **66**, 989–993 (2001). DOI: 10.1023/a:1012369525809

9. Kachalova G. S., Rogulin E. A., Yunusova A. K., Artyukh R. I., Perevyazova T. A., Matvienko N. I., Zheleznyaya L. A., and Bartunik H. D. Structural analysis of the heterodimeric type IIS restriction endonuclease R.BspD6I acting as a complex between a monomeric site-specific nickase and a catalytic subunit. *J. Mol. Biol.*, **384**, 489–502 (2008). DOI: 10.1016/j.jmb.2008.09.033
10. Artyukh R. I., Fatkhullin B. F., Kachalova G. S., Antipova V. N., Perevyazova T. A., and Yunusova A. K. Structural analysis of cysteine-free Nt.BspD6 nicking endonuclease and its functional features. *Biochim. Biophys. Acta — Proteins Proteom*, **1870** (3), 140756 (2022). DOI: 10.1016/j.bbapap.2022.140756
11. Artyukh R. I., Fatkhullin B. F., Antipova V. N., Perevyazova T. A., Kachalova G. S., and Yunusova A. K. Effect of reversion back to Cys11 on the structure and function of S11C Cys-free Nt.BspD6I. *Crystrallography Reports*, **68** (6), 857–863 (2023). DOI: 10.1134/S1063774523700384
12. Rogulin E. A., Perevyazova T. A., Zheleznyaya L. A., and Matvienko N. I. Plasmid pRARE as a vector for cloning to construct a superproducer of the site-specific nickase N.BspD6I. *Biochemistry (Moscow)*, **69**, 1123–1127 (2004). DOI: 10.1023/B:BIRY.0000046886.19428.d5
13. Hellman L. M. and Fried M. G. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat. Protoc.* **2** (8), 1849–1861 (2007). DOI: 10.1038/nprot.2007.249
14. Kuriata A., Iglesias V., Kurcinski M., Ventura S., and Kmiecik S. Aggrescan3D standalone package for structure-based prediction of protein aggregation properties. *Bioinformatics*, **35** (19), 3834 (2019). DOI: 10.1093/bioinformatics/btz143
15. Conchillo-Sole O., de Groot N. S., Aviles F. X., Vendrell J., Daura X., and Ventura S. AGGRESAN: a server for the prediction and evaluation of ‘hot spots’ of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinformatics*, **8** (1), 65 (2007). DOI: 10.1186/1471-2105-8-65
16. Zambrano R., Jamroz M., Szczasiuk A., Pujols J., Kmiecik S., and Ventura S. AGGRESAN3D (A3D): server for prediction of aggregation properties of protein structures. *Nucl. Acids Res.*, **43** (W1), W306–W313 (2015). DOI: 10.1093/nar/gkv359
17. Sekerina S. A., Grishin A. V., Ryazanova A. Yu., Artyukh R. I., Rogulin E. A., Yunusova A. K., Oretskaya T. S., Zheleznyaya L. A., and Kubareva E. A. Oligomerization of sitespecific nicking endonuclease BspD6I at high protein concentrations. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **38**, 376–382 (2012). DOI: 10.1134/s1068162012040127
18. Acuner Ozbabacan S. E., Engin H. B., Gursoy A., and Keskin O. Transient protein-protein interactions. *Protein Eng. Des. Sel.*, **24**, 635–648 (2011). DOI: 10.1093/protein/gzr025
19. Talley K., Kundrotas P., and Alexov E. Modeling salt dependence of protein-protein association: Linear vs non-linear Poisson-Boltzmann equation. *Commun. Comput. Phys.* **3**, 1071–1086 (2008).
20. Zhang Z., Witham S., and Alexov E. On the role of electrostatics in protein-protein interactions. *Phys. Biol.*, **8** (3), 035001 (2011). DOI: 10.1088/1478-3975/8/3/035001

The Nature of Intermolecular Interactions Affecting Oligomerization of Nt.BspD6I Nickase

V.N. Antipova*, A.K. Yunusova*, and R.I. Artyukh*

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Knowledge of the nature of intermolecular interactions and amino acid residues unveiling their origin is necessary to enable alteration of the stability of intermolecular complexes. In this work, using Nt.BspD6I nickase as an example, it was shown that hydrophobic interactions have an influence on the protein's ability to oligomerization and that chemical and geometric complementarity of external surfaces is a necessary condition for the formation of stable homo complexes.

Keywords: intermolecular interactions, Nt.BspD6I nickase, hydrophobic surfaces, oligomerization, homodimers