

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Станишневa-Коновалова Татьяна Борисовна

**РЕГУЛЯЦИЯ ДИНАМИКИ МЕМБРАН F-BAR-ДОМЕННЫМ БЕЛКОМ
NERVOUS WRECK**

Специальность: 03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2016

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова (зав. кафедрой – доктор биологических наук, академик РАН, М.П. Кирпичников).

Научный руководитель:

Соколова Ольга Сергеевна

доктор биологических наук, доцент кафедры биоинженерии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», профессор Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Крупянский Юрий Федорович

доктор физико-математических наук, профессор, зам. директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической физики им. Н.Н.Семёнова Российской академии наук»

Минин Александр Александрович

кандидат биологических наук, заведующий отделом клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт белка Российской академии наук»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «16» июня 2016 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.96 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы 1/24, МГУ, Биологический факультет, аудитория «Новая».

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова и на сайте

<http://www.bio.msu.ru/dissertations/view.php?ID=752>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



М.Г. Страховская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Многие процессы жизнедеятельности клетки сопряжены с изменением формы мембран, которое регулируется цитозольными белками, обратимо связывающимися с мембранами для формирования необходимых структур. Центральными регуляторами мембранных перестроек у всех эукариот являются белки, содержащие BAR-домены, взаимодействующие с отрицательно заряженными липидами. Изменения уровня экспрессии или мутации в генах, кодирующих BAR-доменные белки, связаны с рядом серьёзных неврологических и аутовоспалительных заболеваний, а также некоторыми видами инвазивных опухолей, что делает эти белки потенциальной терапевтической мишенью. Несмотря на активное изучение данной группы белков, структуры подавляющего большинства BAR-доменов пока не определены, также не изучены механизмы их воздействия на мембрану и способы регуляции активности BAR-доменов в контексте полноразмерных белков. В данной диссертационной работе с помощью методов просвечивающей электронной микроскопии и компьютерного моделирования проводилось изучение взаимодействия F-BAR-доменного белка Nervous wreck (Nwk) с липидными мембранами.

Nwk является нейрональным белком, функции которого связаны с интернализацией рецепторов фактора роста и регуляцией роста нейронов в нервно-мышечном синапсе *Drosophila melanogaster*. Гомологи Nwk присутствуют у многих организмов, от насекомых до высших позвоночных, а в геноме млекопитающих обнаружены два гомолога, которые вовлечены в мембранные перестройки в стереоцилиях и нейронах мозжечка. Рост нейронов и образование новых связей лежат в основе обучения и памяти, что указывает на актуальность исследования белков, регулирующих эти процессы.

Цели и задачи

Целью данного исследования было изучить механизмы регуляции динамики мембран F-BAR-доменным белком Nwk. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Создание модельных липидных мембран, содержащих отрицательно заряженный липид ФИ(4,5)Ф₂;
2. Изучение влияния концентрации ФИ(4,5)Ф₂ на свойства мембраны методом молекулярной динамики;
3. Изучение взаимодействия F-BAR-домена Nwk с ФИ(4,5)Ф₂-содержащей липидной мембраной методом молекулярной динамики и определение аминокислотных остатков, критических для взаимодействия;
4. Изучение способа олигомеризации F-BAR-доменов Nwk на липидном монослое с помощью электронной микроскопии;
5. Получение трёхмерных реконструкций полноразмерного Nwk на липидах и на углеродной подложке с помощью электронной микроскопии макромолекул и изучение конформационных изменений белка при взаимодействии с мембраной.

Научная новизна и практическая значимость работы

В данной диссертационной работе с помощью метода молекулярной динамики изучено взаимодействие F-BAR-домена Nwk с модельным липидным бислоем и выявлены аминокислотные остатки, имеющие наибольшее значение для связывания с отрицательно заряженными липидами. С помощью метода просвечивающей электронной микроскопии были впервые получены трёхмерные реконструкции полноразмерного Nwk в связанном и не связанном с мембраной состояниях. Различие двух реконструкций позволило предположить изменение конформации белка при связывании с мембраной. Полученные результаты имеют большое значение для изучения регуляции динамики клеточных мембран и роста нейронов.

Личный вклад автора

Основная работа (получение изображений методом просвечивающей электронной микроскопии, построение трёхмерных реконструкций молекул, создание компьютерных моделей и проведение вычислительных экспериментов), обработка полученных данных и формулирование выводов выполнены автором самостоятельно. Планирование исследований, обсуждение и обобщение полученных результатов осуществлялись совместно с руководителем д.б.н., доцентом Соколовой О.С.

Положения, выносимые на защиту

1. Молекулярная динамика модельных липидных мембран показывает, что увеличение количества ФИ(4,5)Ф₂ приводит к возрастанию упорядоченности липидов.
2. Согласно результатам моделирования взаимодействия димеризованного F-BAR-домена Nwk с мембраной, сначала димер связывается с мембраной концевыми участками, а затем центральным регионом на вогнутой поверхности.
3. Методом электронной микроскопии макромолекул продемонстрировано, что F-BAR-домен белка Nwk формирует особые зигзагообразные паттерны на липидной мембране, что приводит к появлению мембранных гребешков на поверхности липосом и к образованию выступов в клетках S2.
4. У полноразмерного Nwk в автоингибированной конформации SH3-домены взаимодействуют с вогнутой поверхностью димеризованного F-BAR-домена, а при связывании с мембраной SH3-домены смещаются на боковые стороны димера.

Апробация работы

Результаты проведенных исследований были представлены в виде устных и стендовых докладов на российских и международных конференциях и школах: на 1-ой международной конференции молодых учёных ВЗ (Москва – 2016), 40-ом конгрессе FEBS (Берлин – 2015), 38-ом конгрессе FEBS (Санкт-Петербург – 2013), практическом курсе EMBO по обработке изображений для крио-электронной микроскопии (Лондон – 2013), 16-ой зимней школе СИМО (Тварминн, Финляндия – 2012), конференции CNRS (Роскоф, Франция – 2011).

Публикации

По материалам работы опубликовано 3 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, и 4 тезиса в сборниках международных научных конференций.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 91 странице машинописного текста и включает введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы, состоящий из 211 наименований. Работа содержит 49 рисунков и 3 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во Введении сформулированы цели и задачи исследования, обоснована актуальность и практическая значимость работы.

Литературный обзор

В начале Литературного обзора рассмотрены основные классы мембранных липидов и механизмы изменения формы мембран. Далее подробно описано семейство BAR-доменных белков и их взаимодействие с мембранами на примере изученных представителей. Также разобраны основы методов молекулярной динамики, электронной микроскопии и принципы получения трёхмерных реконструкций молекул.

Материалы и методы

В данном разделе описаны экспериментальные процедуры работы: создание и валидация модельных липидных мембран и системы «мембрана-белок», подготовка образцов для электронной микроскопии, получение изображений и построение реконструкции полноразмерного белка на углеродной подложке и на липидах.

Результаты и обсуждение

Молекулярная динамика модельных липидных мембран

VAR-доменные белки связываются с мембранами за счёт электростатических взаимодействий положительно заряженных аминокислотных остатков VAR-домена с отрицательно заряженными липидами. Многие белки этой группы, в том числе объект данного исследования Nervous wreck, предпочтительно связываются с фосфоинозидами (ФИ), в частности с фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатом (ФИ(4,5)Ф₂). Локальное увеличение концентрации ФИ позволяет привлекать VAR-доменные белки к местам мембранных перестроек. Для того чтобы оценить, как увеличение концентрации ФИ влияет на свойства мембраны, в первой части работы методом тяжёло-атомной и крупно-зернистой молекулярной динамики исследовались модельные липидные бислои, состоящие из дипальмитоил-фосфатидилхолина (ДПФХ) и дипальмитоил-фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (ДПФИ).

Тяжёло-атомный подход использовался для моделирования двух бислоев с разными концентрациями ДПФИ: первый бислой состоял из 127 молекул ДПФХ и 1 молекулы ДПФИ, второй из 116 ДПФХ и 12 ДПФИ (по 6 ДПФИ в каждом монослое). Из полученных траекторий длиной 150 нс вычислялись следующие параметры: площадь и объём, приходящиеся на одну липидную головку, толщина бислоя, параметр порядка углеводородных цепей и коэффициент диффузии. Все параметры усреднялись по траектории и сравнивались с существующими экспериментальными данными для

мембраны из ДПФХ (рис. 1, таблица 1). Результаты указывают на то, что увеличение количества липидов ДПФИ приводит к уменьшению площади и объёма на липид, а также коэффициента латеральной диффузии ДПФХ. Толщина бислоя и параметр порядка углеводородных цепей, напротив, увеличиваются. Таким образом, увеличение количества ДПФИ в мембране приводит к возрастанию упорядоченности ДПФХ.

На следующем этапе мы провели исследование более крупного бислоя состава 1160 ДПФХ/120 ДПФИ в течение 100 нс, для чего был использован метод крупно-зернистой молекулярной динамики. Мы сравнили параметры данного бислоя с параметрами бислоя с той же концентрацией ДПФИ в тяжёло-атомном представлении. По сравнению с тяжёло-атомным представлением, в крупно-зернистом возрастает площадь на липид и уменьшается толщина бислоя, что свидетельствует о меньшей упорядоченности липидов. Наибольшее различие проявляется в коэффициентах диффузии (таблица 1). Ранее в научных работах было отмечено, что динамика крупно-зернистых моделей идёт в среднем от 2 до 10 раз быстрее по сравнению с моделями с атомарным разрешением. Основной причиной этого является отсутствие трения, возникающего на атомарных степенях свободы, которые отсутствуют в крупно-зернистых моделях. Оценку ускорения для каждого конкретного случая можно проводить на основе различия в коэффициентах диффузии. В нашем случае ускорение составило 2,5 раза.

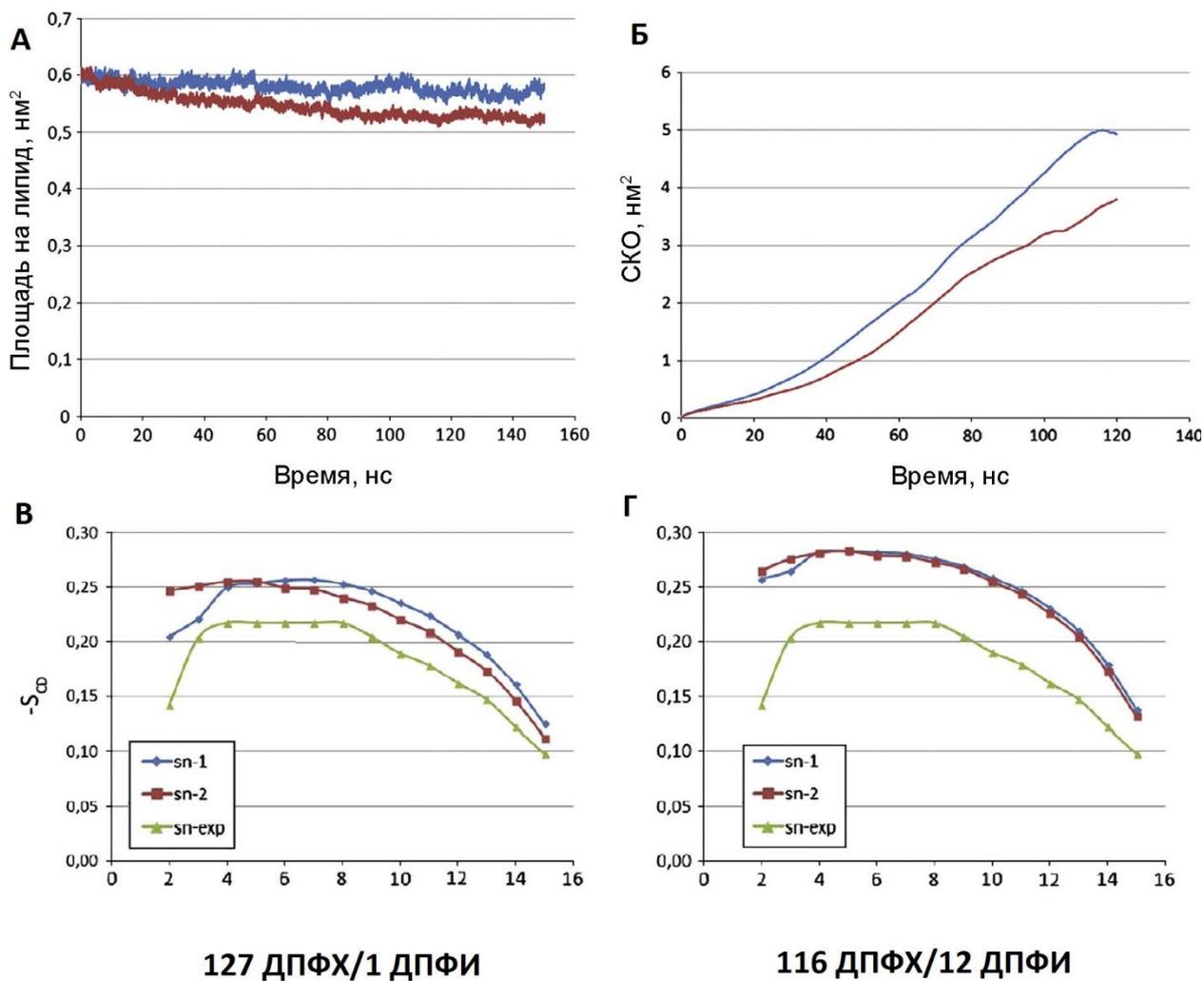


Рисунок 1. Сравнение параметров мембран с разной концентрацией ДПФИ. (А) Площадь на липид в системах 127 ДПФХ/1 ДПФИ (синяя кривая) и 116 ДПФХ/12 ДПФИ (красная кривая). (Б) СКО липидов ДПФХ. Коэффициент диффузии рассчитывался на интервале 30-110 нс. (В) Параметры порядка углеводородных цепей в системах с 1 ДПФИ и (Г) 12 ДПФИ.

Таблица 1. Сравнение параметров бислоев с разной концентрацией ДПФИ.

Параметр	ДПФХ (эксперим.)	1% ДПФИ (тяжёло- атомная модель)	9% ДПФИ (тяжёло- атомная модель)	9% ДПФИ (крупно- зернистая модель)
Площадь на липид, нм ²	0,63-0,64	0,57	0,53	0,6
Объём на липид, нм ³	1,23	1,21	1,14	1,15
Толщина бислоя, нм	3,8	4,2	4,5	4,2
Коэффициент латеральной диффузии, 10 ⁻⁷ см ² /с	0,85-1,2	1,33	1,02	2,62

Таким образом, в первой части работы была показана способность ДПФИ упорядочивать окружающие ДПФХ. Это согласуется с МД экспериментами, проведёнными ранее для бислоя с одной молекулой ФИФ₂, встроенной в бислой из 71 ДПФХ. Головки липидов ДПФХ, находящихся в непосредственном контакте с ФИФ₂, располагаются перпендикулярно поверхности бислоя, в то время как в чистом ДПФХ бислое они практически параллельны. С помощью атомно-силовой микроскопии было показано, что вытаскивание липида ДПФХ, находящегося в контакте с ФИФ₂, требует примерно на 50% больше работы, чем вытаскивание ДПФХ из чистого ДПФХ бислоя. Таким образом, ФИФ₂ формирует микродомен с окружающими липидами, что повышает его устойчивость к вертикальному смещению, вызываемому связывающимися белками.

Молекулярная динамика F-BAR-домена Nwk с липидной мембраной

Во второй части работы модельный бислой, содержащий 9% ДПФИ в бислое из ДПФХ, использовался для изучения взаимодействия F-BAR-домена Nwk с мембраной. Модель димеризованного F-BAR-домена Nwk была построена в программе Phyre по гомологии с известной кристаллической

структурой F-BAR-домена FCHO2. Модель димера имеет характерную для BAR-доменов серповидную форму с боковой стороны и специфическую S-образную форму с выпуклой стороны (рис. 2).

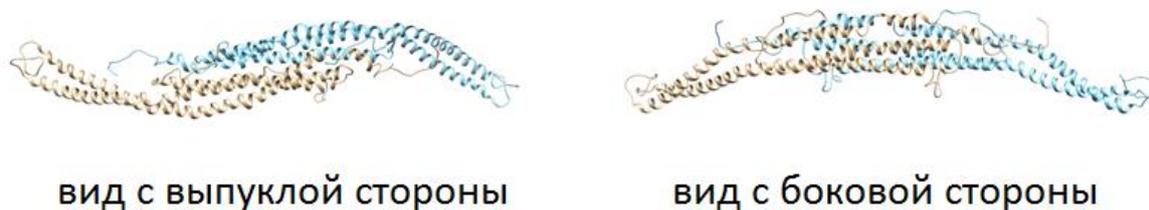


Рисунок 2. Модель димеризованного F-BAR-домена Nwk.

Динамика мембраны с белком проводилась в течение 150 нс, начальная и конечная точки траектории представлены на рисунке 3.

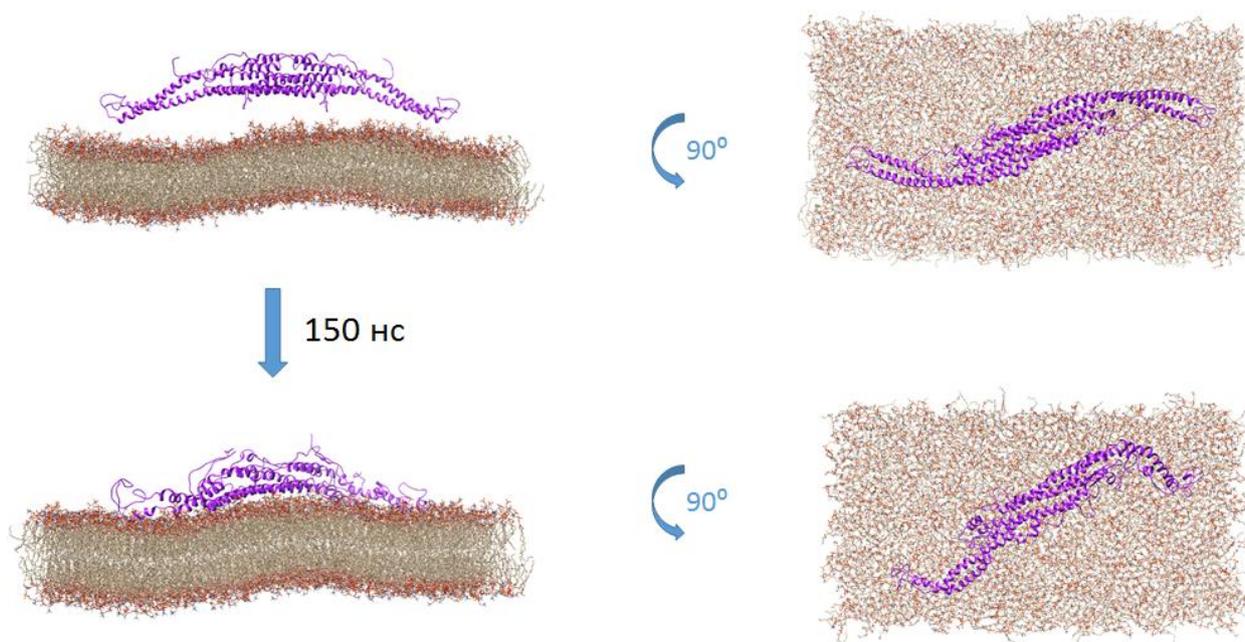


Рисунок 3. Начальная и конечная точки траектории.

В основе связывания F-BAR-доменов с мембранами лежат электростатические взаимодействия положительно заряженных аминокислотных остатков с отрицательно заряженными липидами. Для того, чтобы выяснить, какие а.о. вносят основной вклад в связывание F-BAR-домена Nwk, мы изучали формирование солевых мостиков между остатками лизина/аргинина и фосфатными группами липидов ДПФИ. Для всех

положительно заряженных остатков был проведён расчёт минимального расстояния до липидов ДПФИ за всю траекторию. На рисунке 4 приведены графики для остатков лизина 46 и 183 первого мономера. Из графика следует, что остаток 183 с 10 по 63 нс образует солевой мостик с липидом ДПФИ, а после 63 нс расстояние до ближайшего ДПФИ резко увеличивается. Аналогично выглядят графики для остатков лизина 179, 181 и 196, которые также расположены на концевых участках димера. Расположенные в центральной части димера остатки 46, 52 и 60 образуют солевые мостики с липидами ДПФИ после 70 нс и до конца динамики.

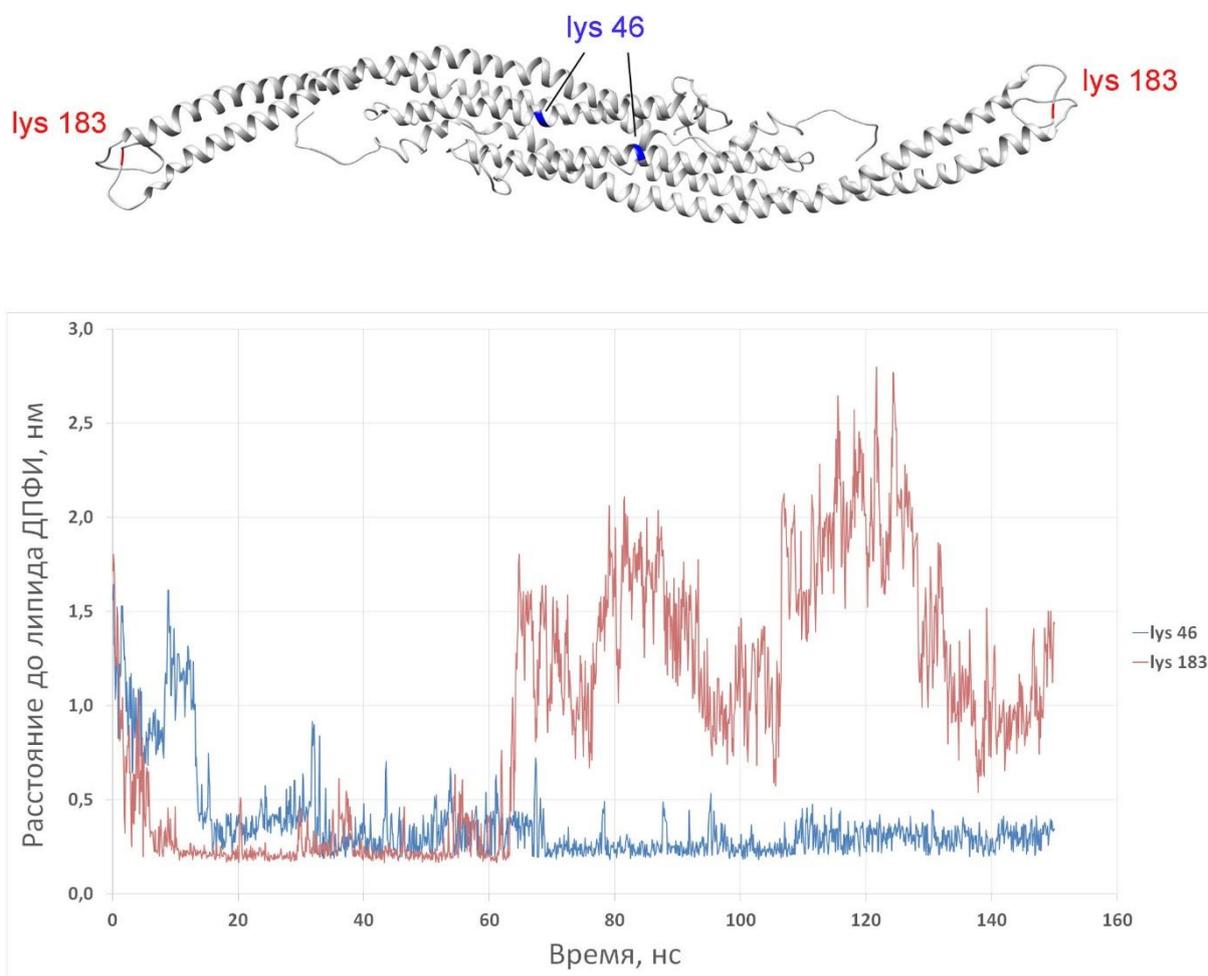


Рисунок 4. Взаимодействие остатков К46 (синяя кривая) и К183 (красная кривая) с липидами ДПФИ.

На рисунке 5 отмечены остатки, образывавшие с ДПФИ солевые мостики, которые сохранялись на протяжении десятков наносекунд. В первом мономере это остатки K25, K46, K60, K52, K154, K179, K181, K183, K196, R200, K302. Во втором мономере – K46, K60, K68, K77, K121, K157, R204. Наиболее стабильные связи с липидами формируются после 60 нс динамики остатками, расположенными в центральной части димера (K46, K60, K68). Остатки лизина, расположенные на концевых участках димера, связываются с ДПФИ в первые 50 нс, а затем теряют связь с мембраной и сохраняют высокую подвижность. Остаток K302, расположенный в неструктурированной С-концевой области F-BAR-домена, также образует солевой мостик с липидом ДПФИ, однако маловероятно, что это взаимодействие реализуется в случае полноразмерного белка, имеющего дополнительные домены на С-конце.

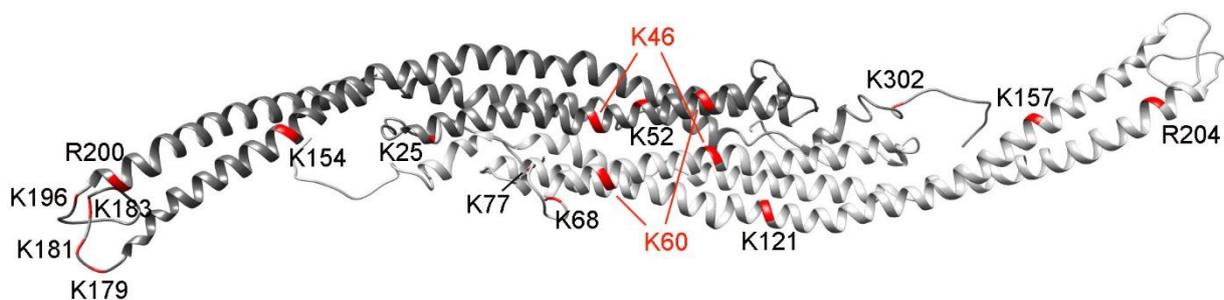


Рисунок 5. Остатки, образывавшие стабильные солевые мостики с липидами в процессе динамики.

Расчёты молекулярной динамики указывают на то, что наиболее важную роль в связывании F-BAR-домена Nwk с мембраной играют положительно заряженные остатки в центральной части димера K46 и K60. Данные результаты согласуются с результатами мутационного анализа, согласно которым замена остатков лизина 46 и 47 нарушает способность F-BAR-домена связываться с мембраной сильнее, чем замена последовательностей на концевых участках. Таким образом, основную роль в связывании с мембраной играет центральная часть димера.

Олигомеризация F-BAR-домена Nwk на мембране

Для изучения активности F-BAR-домена в клетках использовалась клеточная линия S2, в которой не экспрессируется эндогенный Nwk. В результате было обнаружено, что F-BAR-домен Nwk вызывает образование клеточных выступов, что является нетипичной активностью, поскольку большинство исследованных F-BAR-доменов вызывают образование мембранных трубочек, проникающих внутрь клетки. Чтобы выяснить, является ли нетипичная активность Nwk следствием особого способа олигомеризации на мембране, мы сравнили организацию F-BAR-доменов Nwk (фрагмент Nwk¹⁻⁴²⁸) и F-BAR-доменов белка Cip4 (Cip4¹⁻³¹²) на отрицательно заряженных липидных монослоях с помощью электронной микроскопии.

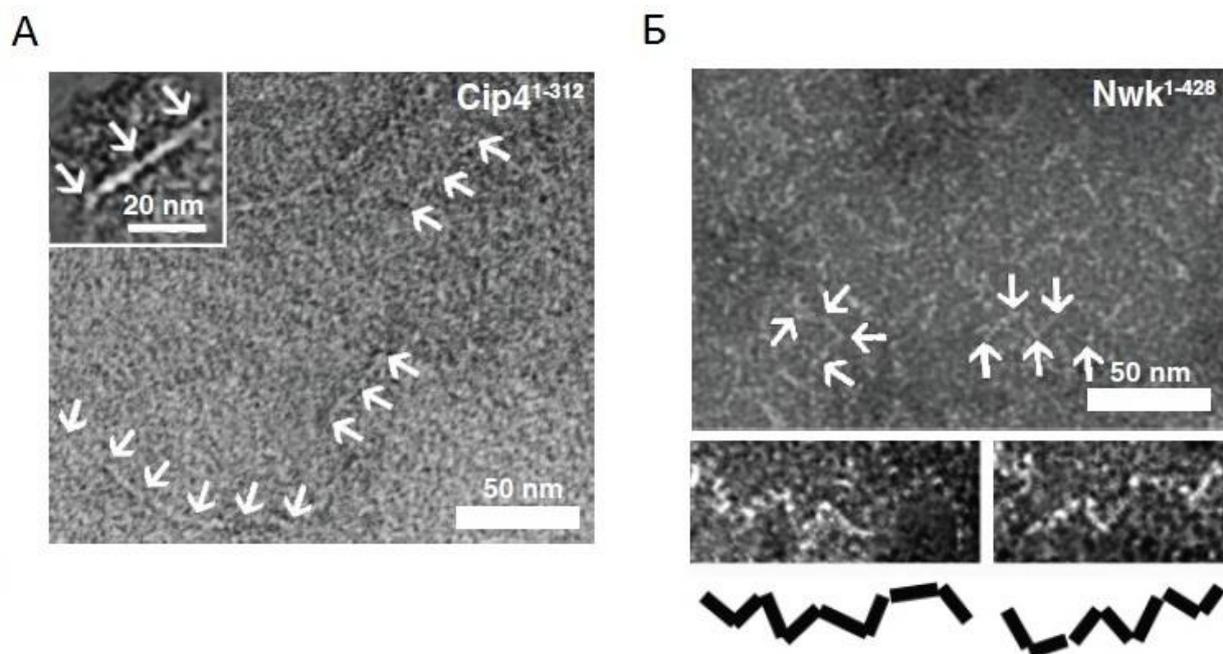


Рисунок 6. Олигомеризация F-BAR-доменов белков Cip4 и Nwk на мембранах.

Cip4¹⁻³¹² собирался в линейные тяжи, где димеры взаимодействовали концевыми участками (рис. 6 А), что согласуется с ранее полученными результатами. В отличие от него, димеры Nwk¹⁻⁴²⁸ собирались на мембране в V-образные, N-образные и зигзагообразные структуры более высокого порядка (рис. 6 Б). В отсутствие липидного монослоя подобных структур не

наблюдалось. Полученные нами результаты позволили предположить механизм формирования трубочек F-BAR-доменами Nwk, отличающийся от известной ранее схемы спиральной организации доменов вокруг трубочки (рис. 7).

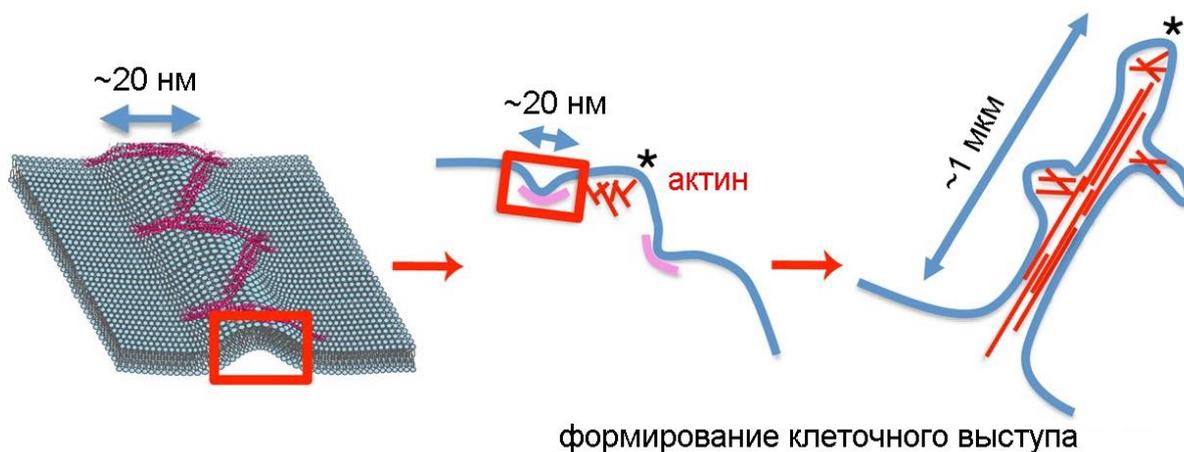


Рисунок 7. Модель активности F-BAR-домена Nwk в клетках S2.

Согласно нашей модели, зигзагообразные структуры создают на мембране гребешок, геометрия которого зависит от угла между димерами и частоты встречаемости димеров, обращённых вогнутой стороной к мембране. В клетках участок мембраны между такими гребешками преобразуется в выступ за счёт полимеризации актиновых филаментов. Данная модель объясняет наблюдаемый эффект при экспрессии F-BAR-домена Nwk в клетках S2, не имеющих эндогенного Nwk. Биологическая роль формирования мембранных гребешков белком Nwk в нейронах дрозофилы связана с динамин-зависимым эндоцитозом. Динамин привлекается к мембране за счёт связывается с SH3a-доменом Nwk.

Помимо взаимодействия с белками-партнёрами, SH3-домены также могут выполнять функцию ингибирования активности BAR-домена. Фрагмент Nwk, содержащий F-BAR-домен и два SH3-домена, демонстрировал меньшую аффинность к заряженным липосомам, чем F-BAR-домен отдельно, а в клетках S2 не вызывал образование характерных клеточных выступов. Также в опытах *in vitro* было показано, что SH3-домены напрямую связываются с F-

BAR-доменом и это взаимодействие носит электростатический характер. Эти результаты говорят о том, что SH3-домены регулируют активность F-BAR-домена Nwk. Однако, связывание SH3-доменов не полностью ингибирует мембран-связывающую активность F-BAR-домена, а лишь повышает необходимую для связывания концентрацию ФИ(4,5)Ф₂: если для связывания F-BAR-домена достаточно 5%-ой концентрации ФИ(4,5)Ф₂ в липосомах, то присутствие SH3-доменов повышает необходимую концентрацию до 20%.

Для того, чтобы выяснить, какие структурные изменения происходят в полноразмерном белке при связывании с липидной мембраной, в следующей части работы были получены трёхмерные реконструкции полноразмерного Nwk на углероде и на липидной мембране.

Структура автоингибированного Nwk

Для исследования структуры Nwk в несвязанном с мембраной автоингибированном состоянии использовался фрагмент Nwk¹⁻⁷³¹, который содержит оба SH3-домена и воспроизводит фенотип дикого типа в клетках дрозофилы. Методом просвечивающей электронной микроскопии негативно контрастированных образцов были получены изображения молекул белка на сетках с углеродной подложкой, из которых в программе IMAGIC была построена трёхмерная реконструкция с разрешением около 20 Å. Для интерпретации полученной электронной плотности с помощью программы Chimera в неё была вписана электронная плотность F-BAR-домена, полученная из предсказанной по гомологии модели (рис. 8).

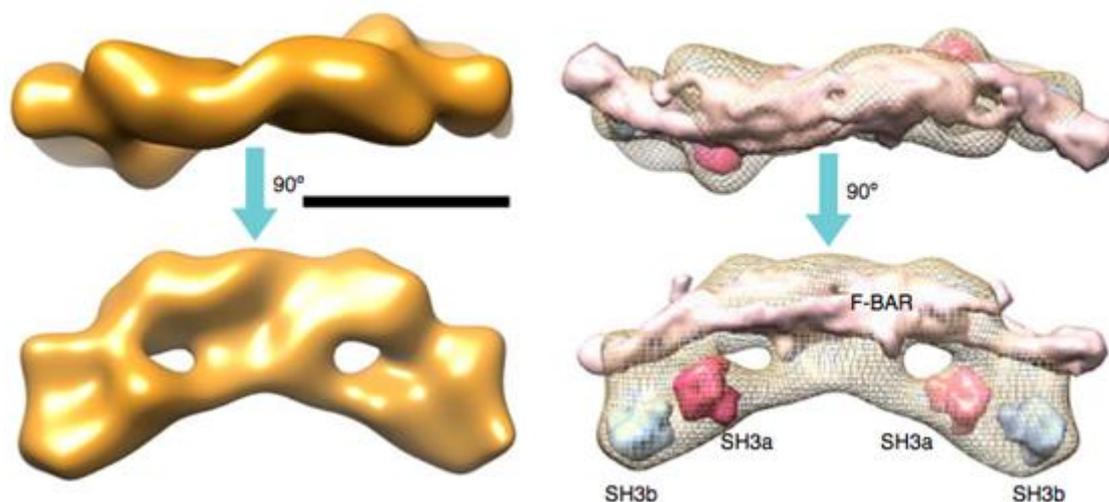


Рисунок 8. Реконструкция полноразмерного Nwk на углеродной подложке (бар – 10 нм).

Построенная реконструкция обладает дополнительной электронной плотностью со стороны мембран-связывающей поверхности F-BAR-домена. Чтобы выяснить расположение SH3-доменов в дополнительной плотности, сравнивались изображения частиц Nwk¹⁻⁶³³ (фрагмент, у которого отсутствует SH3b-домен) и Nwk¹⁻⁴²⁸ (фрагмент без SH3-доменов). Разность электронных плотностей указывает на то, что дополнительная плотность первого фрагмента располагается в центральной части димера (рис. 9).

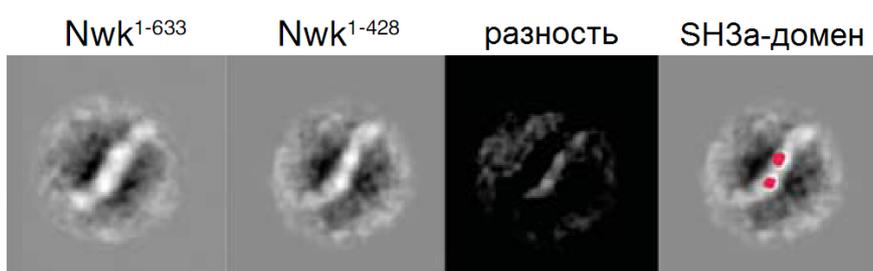


Рисунок 9. Разностная карта, показывающая положение SH3a-доменов (красные точки).

Следовательно, в построенной реконструкции SH3a-домен располагается в центральной области, а SH3b домен занимает положение ближе к концам (рис. 9, справа). Таким образом, по нашим данным в

несвязанном с мембраной состоянии С-конец белка блокирует вогнутую поверхность F-BAR-домена, снижая его способность связываться с мембраной.

Структура связанного с мембраной Nwk

Трёхмерная реконструкция Nwk¹⁻⁷³¹, связанного с липидным монослоем, содержащем 10% ФИ(4,5)Ф₂, была построена в программе EMAN2 с применением метода случайного конического наклона, а затем улучшалась в программе FREALIGN. Её разрешение составило около 30 Å. Полученная реконструкция имела форму гантели, отличающуюся от формы Nwk на углеродной подложке (рис. 10).

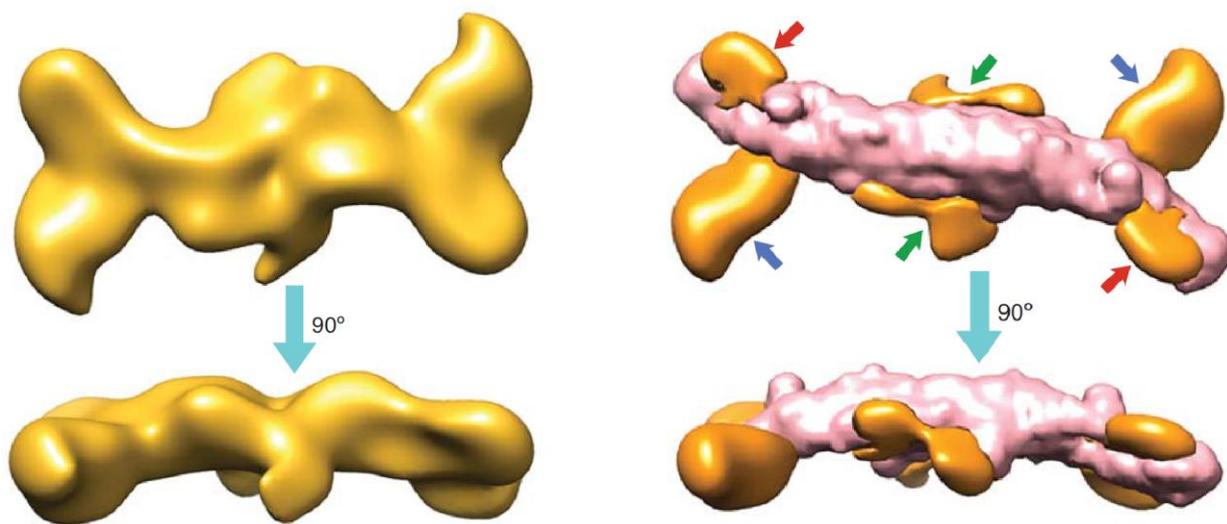


Рисунок 10. Реконструкция полноразмерного Nwk на липидах (слева) и она же со вписанным F-BAR-доменом (справа). Красные стрелки указывают расположение SH3a-доменов, синие SH3b-доменов, зелёные – С-концевой последовательности.

Сравнение со структурой F-BAR-домена показало наличие небольшой дополнительной массы на внутренней поверхности S-образного димера, большей массы на внешней поверхности, а также дополнительной массы рядом с центром F-BAR. Чтобы определить, какая из дополнительных плотностей отвечает каждому из SH3-доменов, мы так же проанализировали

фрагменты Nwk, у которых не хватало одного или обоих SH3-доменов. Вычитание классовой суммы Nwk^{1-428} из Nwk^{1-633} показало наличие дополнительной массы на внутренней стороне кривой F-BAR домена (рис. 11, сверху). Вычитание Nwk^{1-633} из Nwk^{1-731} выявило дополнительную массу на внешней стороне кривой F-BAR домена (рис. 11, снизу). Это позволило сделать вывод о том, что небольшая масса на внутренней стороне кривой отвечает SH3a, а большая масса отвечает SH3b и, возможно, линкерной последовательности между ними. При этом SH3-домены не закрывали концы F-BAR, что согласуется с нашими результатами о вовлечённости концевых остатков в связывание мембраны.

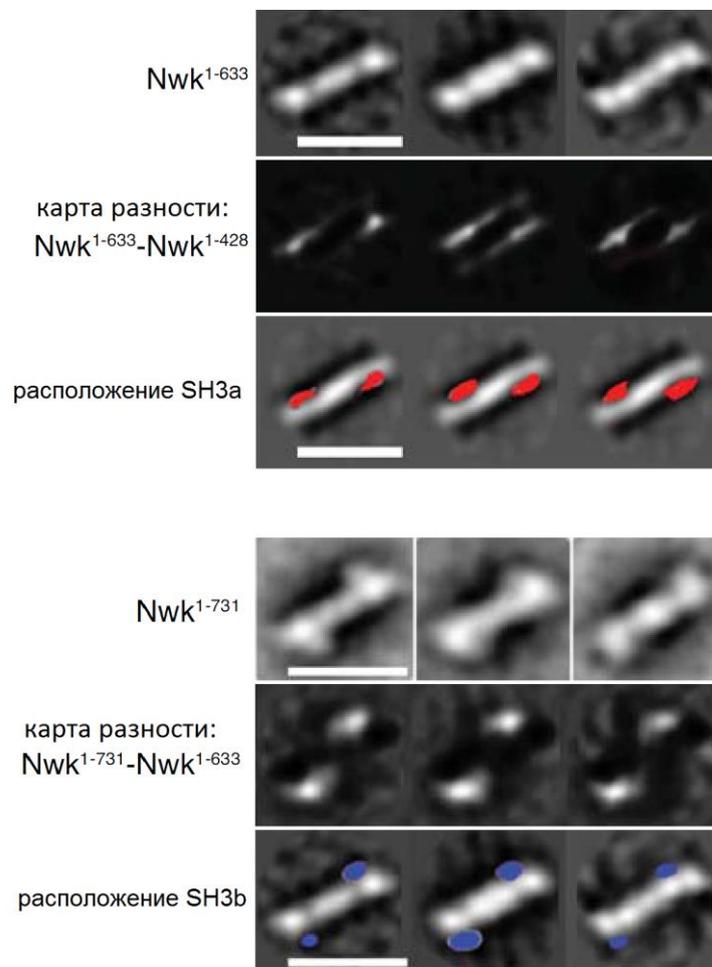


Рисунок 11. Разностная карта, показывающая положение SH3a- (красных) и SH3b- (синих) доменов.

Дополнительная плотность в центральной части реконструкции может соответствовать 115 а.о., С-терминальных по отношению к F-BAR, поскольку эта масса также видна при вычитании Nwk^{1-313} из Nwk^{1-428} (рис. 12, снизу). Данная плотность отсутствовала в структуре Nwk^{1-731} на углеродной подложке и в классовых суммах Nwk^{1-428} на углеводе или была иначе ориентирована.

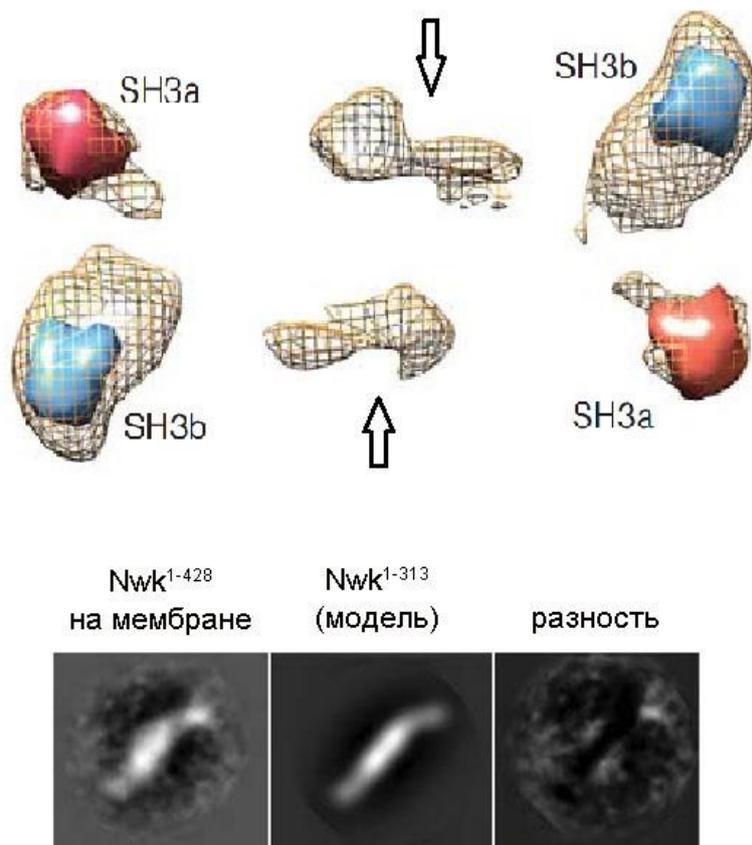


Рисунок 12. Дополнительная плотность в центральной части реконструкции, соответствующая N-концевой последовательности (стрелки).

Таким образом, при связывании Nwk с мембраной, и С-концевая альфа-спираль и SH3 домены меняют свои позиции относительно F-BAR домена, перемещаясь от вогнутой стороны в положение в латеральной части F-BAR.

Результаты данной работы позволяют предложить следующую модель взаимодействия Nwk с мембранами (рис. 13). Полноразмерный белок Nwk в клетке находится в автоингибированном состоянии, обусловленном внутримолекулярными взаимодействиями между F-BAR-доменом и SH3-доменами. В такой конформации снижена способность F-BAR-домена

связываться с мембранами, а SH3-домена – с лигандами. При повышенном количестве ФИ(4,5)Ф₂ связывание с мембраной происходит и структура Nwk претерпевает значительные изменения, в ходе которых SH3-домены перемещаются с вогнутой поверхности F-BAR-домена к боковым сторонам. Однако, для полной активации белка необходимо взаимодействие с другими белками-партнёрами, которые ещё предстоит изучить.

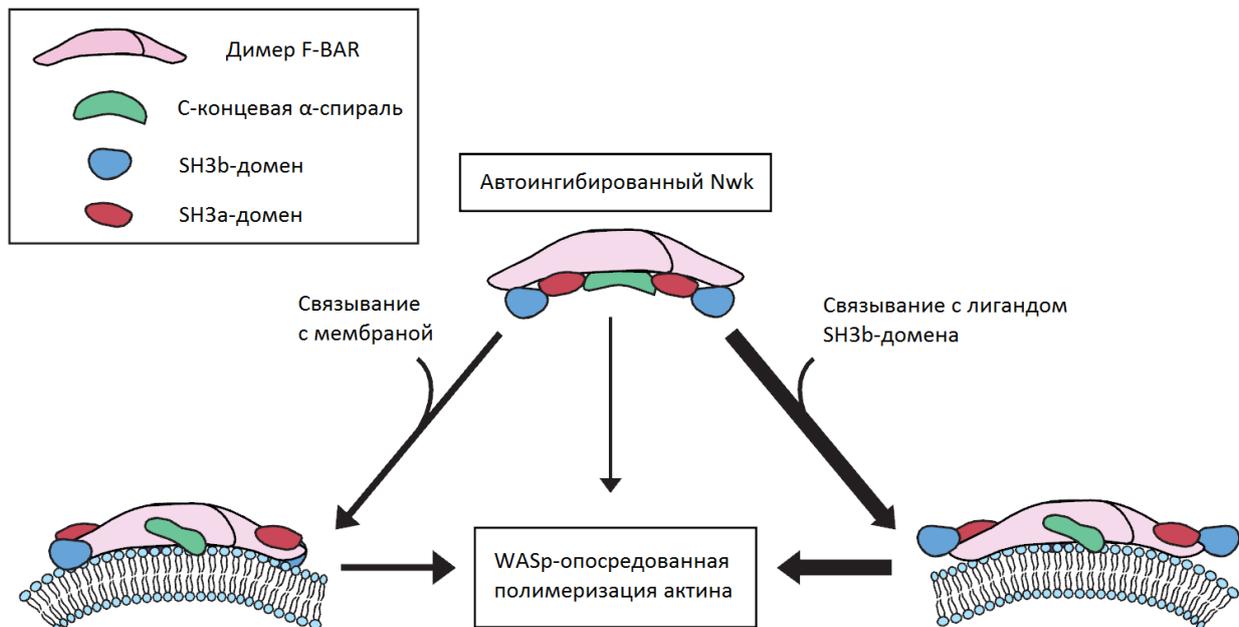


Рисунок 13. Модель взаимодействия Nwk с мембраной. При связывании автоингибированного Nwk с мембраной SH3-домены перемещаются с вогнутой поверхности на боковые стороны. Для полного снятия автоингибирования необходимо взаимодействие с другими белками.

Заключение

В данной работе исследовалось взаимодействие F-BAR-доменного белка Nervous wreck с мембранами, содержащими отрицательно заряженный липид ФИ(4,5)Ф₂. Большинство F-BAR-доменов при гиперэкспрессии в клетках вызывают образование проникающих внутрь клетки трубочек, но F-BAR-домен Nwk вызывает образование клеточных выступов. Результаты молекулярной динамики указывают на важность концевых и центральных участков димера для связывания с ФИ(4,5)Ф₂. С помощью метода электронной микроскопии было показано, что F-BAR-домены Nwk организуются на

мембране особым образом, что является причиной нетипичной активности. В полноразмерном белке активность F-BAR-домена блокируется внутримолекулярным связыванием SH3-доменов. Получение трёхмерных реконструкции показало, как располагаются SH3-домены Nwk в растворе и как изменяется их расположение при связывании с мембраной. На основании полученных результатов была предложена модель активности Nwk, согласно которой связывание автоингибированного белка с мембраной и изменение его конформации является первым шагом к его активации.

Выводы

1. Молекулярная динамика модельных липидных мембран показывает, что увеличение количества $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ приводит к возрастанию упорядоченности липидов. В результате вокруг $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ формируется микродомен, что может повышать его устойчивость к вертикальному смещению при связывании с белками.
2. Согласно результатам моделирования взаимодействия димеризованного F-BAR-домена Nwk с мембраной, сначала белок связывается с ней концевыми участками (а.о. K179, K181, K183, K196), а затем центральным участком (K46, K60). Вогнутая поверхность димера уплощается, K46 и K60 образуют стабильные солевые мостики с $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$, а концевые участки отделяются от мембраны.
3. Методом электронной микроскопии макромолекул продемонстрировано, что F-BAR-домен белка Nwk формирует зигзагообразные паттерны на поверхности липидной мембраны, содержащей $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$. Это приводит к появлению мембранных гребешков на поверхности липосом и к образованию выступов в клетках S2.
4. Полноразмерный Nwk в растворе автоингибирован SH3-доменами, которые связываются с вогнутой поверхностью F-BAR-домена и препятствуют его взаимодействию с мембраной при отсутствии в ней достаточного количества $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$. При связывании Nwk с мембраной,

содержащей повышенную концентрацию $\text{FI}(4,5)\text{F}_2$, наблюдается значительное конформационное изменение структуры, при котором SH3-домены смещаются на боковую сторону димера.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах из перечня ВАК РФ

1. Molecular dynamics simulations of negatively charged DPPC/DPPI lipid bilayers at two levels of resolution / Stanishneva-Konovalova T. B., Sokolova O. S. // *Computational and Theoretical Chemistry*. — 2015. — Vol. 1058. — P. 61–66.
2. Formation of membrane ridges and scallops by the f-bar protein nervous wreck / Agata N. Becalska, Charlotte F. Kelley, Cristina Berciu, Tatiana B. Stanishneva-Konovalova, Xiaofeng Fu, ShiYu Wang, Olga S. Sokolova, Daniela Nicastro, and Avital A. Rodal// *Molecular Biology of the Cell*. — 2013. — Vol. 24, no. 15. — P. 2406–2418.
3. Повышение контраста изображения при исследовании бионаночастиц / Е. Печникова, Т. Станишнева-Коновалова, О. Волох, О. Соколова // *Наноиндустрия*. — 2013. — Т. 5, № 43. — С. 18–25.

Тезисы докладов

1. Regulation of membrane dynamics by F-BAR protein Nwk / Stanishneva-Konovalova T.B., Kelley C., Rodal A.A., Sokolova O.S. // *1st B3 international conference for young Scientists*. — 2016. — P. 24.
2. Structural study of nervous wreck autoinhibition / T. Stanishneva-Konovalova, C. Kelley, A. Popinako et al. // *FEBS Journal*. — 2015. — Vol. 282 of Special Issue: 40th FEBS Congress, The Biochemical Basis of Life. — P. 22.
3. Autoregulation of the Nervous Wreck F-BAR Domain Favors Self-Assembly and Membrane Deformation / Charlotte Kelley, Emily Messalaar, Tania Eskin, Tatiana Stanishneva-Konovalova, Olga Sokolova, Avital Rodal // *FASEB Journal*. — 2015. — Vol. 29, no. 1_Supplement. — P. 886.22.
4. Molecular dynamics simulation of negatively charged DPPC/DPPI lipid bilayers and their interactions with I-BAR domains / T. Stanishneva-Konovalova, O. Sokolova // *FEBS Journal*. — 2013. — Vol. 280 of Special Issue: 38th FEBS Congress. — P. 541–542.