

УДК 577.322.4:5:7

## ВЛИЯНИЕ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ НА ПРОСТРАНСТВЕННУЮ СТРУКТУРУ ТУБУЛИНОВ РАСТЕНИЙ

*Ныторко А. Ю., Демчук О.Н., Емец А.И., Блюм Я.Б.*

### Вступление

Одной из характерных особенностей семейств как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -тубулинов является их способность подвергаться многочисленным посттрансляционным модификациям [1 –3]. Посттрансляционные модификации тубулинов присущи всем без исключения группам эукариот, а для некоторых из них, в частности для простейших, являются единственным источником микрогетерогенности популяции тубулинов [4]. Ряд модификаций, таких как ацетилирование, фосфорилирование и полиглутамилирование, пальмитилирование, являются универсальными для различных белков. Другие виды модификаций, например, полиглицилирование и тирозилирование/детирозилирование выявлены лишь в случае тубулина. Поскольку большинство модификаций тубулина имеет обратимый характер, они обеспечивают потенциал для производства высокодинамических подгрупп в границах популяции тубулинов. Хотя эти модификации вносят определенные биохимические отличия в молекулы тубулина, нужно отметить, что они могут также маскировать изотип-специфические отличия и таким образом уменьшать гетерогенность тубулинов [2].

Ацетилирование – универсальный вид посттрансляционных модификаций белков – играет одну из ключевых ролей в регуляции стабильности белковых и белок-нуклеиновых комплексов. Например, степень ацетилирования гистонов в определенных участках хроматина четко коррелирует со степенью ее упаковки и таким образом регулирует уровень экспрессии генов, которые расположены на этих участках [5]. Если мы рассмотрим явление ацетилирования у тубулинов, то сможем увидеть, что в общем случае ацетильная группа присоединяется к остатку лизина в позиции 40 молекулы  $\alpha$ -тубулина. В случае отсутствия лизина точно в этом месте ацетилирование может происходить в пределах от 32 до 45 аминокислотного остатка при наличии соответствующего остатка лизина в этой части последовательности [6].

Наличие ацетилизованного тубулина характерно для особо стабильных микротрубочковых структур, например, аксоном, хотя в некоторых случаях ацетилирование может иметь место и в микротрубочках митотического веретена. Ацетилирование происходит после сборки микротрубочек [7], и общая корреляция со стабильными микротрубочками – реальное отображение относительного промежутка времени, на протяжении которого индивидуальные субъединицы микротрубочек являются субстратом для ацетилтрансфераз [8].

Поскольку наличие или отсутствие ацетилирования приводит к соответствующим изменениям в стабильности макромолекулярных комплексов, напрашивается закономерный вывод о наличии определенных стерических отличий в молекуле тубулина, которые возникают вследствие ацетилирования. Однако вопрос о том, как именно ацетилирование определенных аминокислотных остатков отражается на конформационных особенностях молекулы тубулина, и в частности растительного происхождения, до сих пор не получил однозначного ответа. В связи с этим именно реконструкция пространственной структуры ацетилизованной и неацетилизованной форм тубулинов и их сравнительный анализ и составили круг вопросов нашей работы.

#### **Материалы и методы**

##### **Разработка топологии ацетилизованного лизина**

Топология модифицированного лизина разрабатывалась с помощью силовых параметров GROMACS [9]. Информация относительно топологии ацетолизина была внесена в соответствующие базы данных программного пакета GROMACS.

##### **Разработка моделей ацетилизованного тубулина**

Промодели ацетилизованного тубулина были получены путем замены остатка лизина в положении 40 на остаток ацетилизованного лизина в промодели молекулы  $\alpha$ -тубулина гусиной травы, которая была разработана ранее [10]. Оптимизация полученной промодели осуществлялась с помощью программного пакета GROMACS.

##### **Визуализация и анализ данных**

Визуализация и сравнительный анализ полученных моделей проводился с помощью программ SwissPDBViewer [11] и MolMol [12]. Вычисление среднеквадратичного отклонения между молекулами ацетилизованного и неацетилизованного  $\alpha$ -тубулина оценивалось с помощью программы MolMol.

### Результаты и обсуждение

Остаток лизина в положении 40 аминокислотной последовательности молекулы  $\alpha$ -тубулина локализован непосредственно на молекулярной поверхности внутри полости микротрубочки (рис. 1). Изменения в структуре молекулы  $\alpha$ -тубулина, которые происходят вследствие ацетилирования,

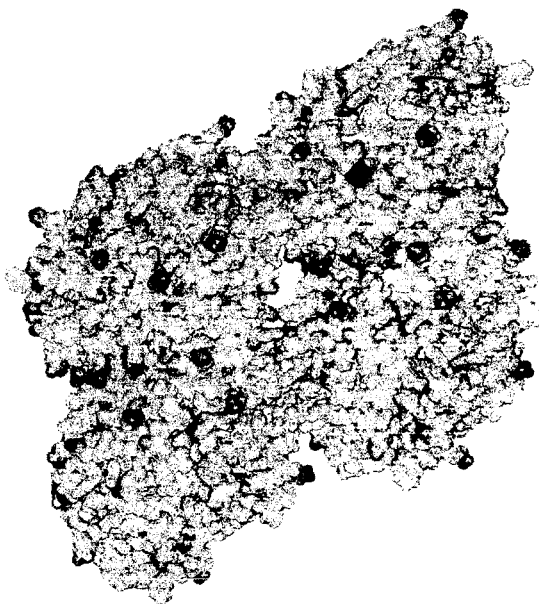


Рис. 1. Вид молекулярной поверхности тетрамера тубулина (два латерально контактирующих гетеродимера) со стороны внутренней полости микротрубочки. Остаток лизина-40 выделен черным цветом.

распределены следующим образом. Самая существенная конформационная перестройка происходит непосредственно в 40-й позиции, которая является закономерным последствием самого акта ацетилирования этого аминокислотного остатка. Среднеквадратичное отклонение для данной позиции составляет 2,74 Å. Другие наблюдаемые структурные изменения сгруппированы в 5 кластеров (рис. 2).

Первый кластер, расположенный непосредственно вблизи сайта ацетилирования, состоит из аминокислотных остатков Glu-22, Asp-39, Thr-41 и Gln-85. Второй, наибольший, кластер расположен в районе интердимерного контакта и состоит из 9 аминокислотных остатков – Asp-33, Phe-244, Asp-245, Gly-246, Leu-248, Asn-249, Asn-356, Tyr-357, Gln-358. Еще три кластера

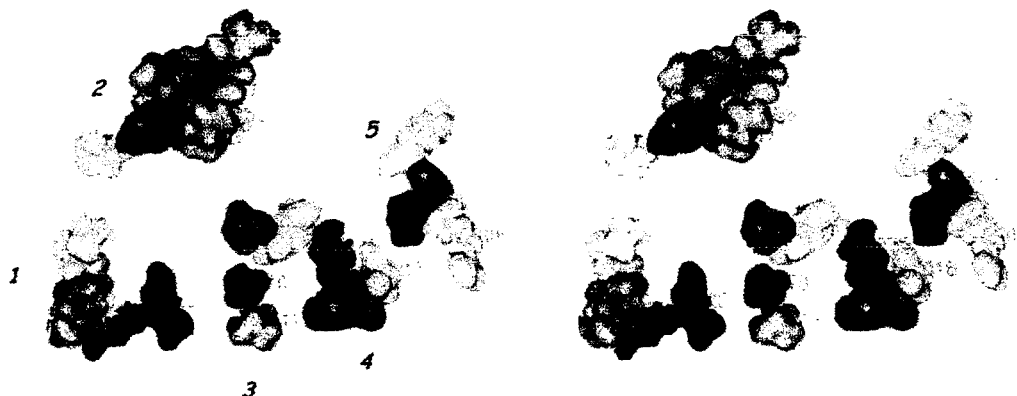


Рис. 2. Стереобразное пространственное расположение аминокислотных остатков с изменённой вследствие ацетилирования конформацией. Кластеры пронумерованы чёрными цифрами, аминокислотные остатки – серыми.

содержат по четыре остатка: третий кластер состоит из аминокислот Thr-170, Val-171, Ala-201, Phe-267, четвертый содержит Ile-212, Ser-216, Leu-217, Val-275, а в последний из них входят Pro-307, Arg-308, Gly-310, Lys-311. Первые два кластера хорошо экспонированы на поверхности тубулина, три маленьких кластера преимущественно погружены в толщу молекулы (рис. 3).

Пространственное распределение участков молекулы  $\alpha$ -тубулина, которые подвергаются конформационным преобразованиям, свидетельствует о том, что добавление лишь одной ацетильной группы имеет своим следствием конформационные изменения не только непосредственно в районе сайта модификации, но и в отдаленных участках молекулы, в частности на разных контактных поверхностях (как на интердимерной, так и на интрадимерной). Хотя изменения, которые наблюдаются, очень незначительны по абсолютным значениям – максимальная величина среднеквадратичного отклонения не превышает 0,09 Å – но при условии высокого сходства ацетилированной и неацетилированной молекулы (0,02 Å) эти отличия можно считать довольно существенными. В пользу этого вывода свидетельствует кластеризация остатков с измененной конформацией, а не хаотичное распределение их в пространстве молекулы.

Сравнительный анализ динамики ацетилированного и неацетилированного тубулина (рис.4) также свидетельствует о влиянии локальной модификации на поведение молекулы в целом. Колебание значений среднеквадратичного отклонения происходит в границах от 0,18 (232) до 7,39 (196). Отклонение по всей молекуле составляет 2,79 Å, что почти вдвое превышает аналогичный показатель для пара “растительный  $\alpha$ -тубулин – животный  $\alpha$ -тубулин” (неопубликованные данные).

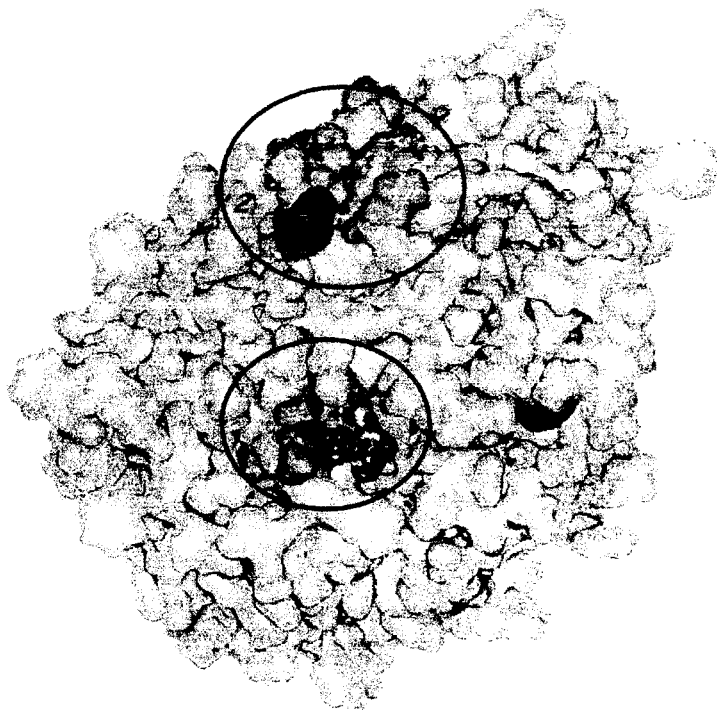


Рис. 3. Молекулярная поверхность  $\alpha$ -тубулина с экспонированными кластерами 1 и 2 (выделены овальными рамками).

Таким образом, можно считать подтвержденным, что влияние ацетилирования не ограничивается локальными изменениями сайта модификации, но существенным образом влияет на поведение молекулы в целом. Наличие структурных изменений в контактных зонах молекулы  $\alpha$ -тубулина является возможной причиной стабилизации ацетилированных микротрубочек вследствие повышения стерического сродства упомянутых контактов.

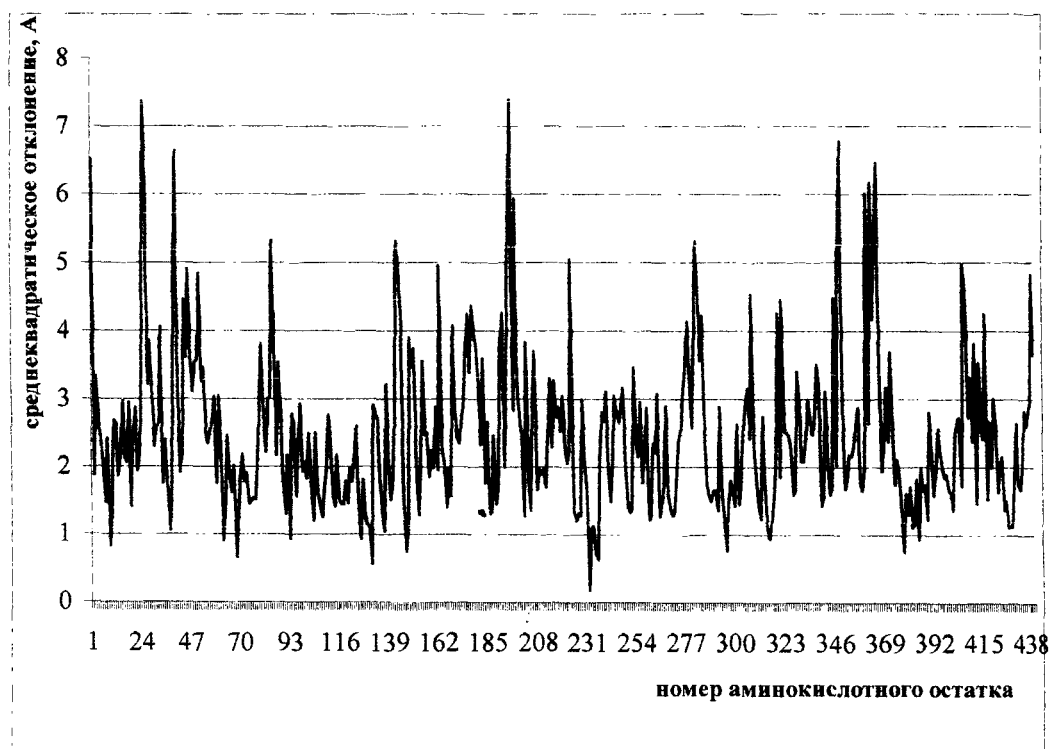


Рис. 4. Распределение среднеквадратичного отклонения между аминокислотными остатками ацетилированной и неацетилированной формы  $\alpha$ -тубулина после моделирования молекулярной динамики в интервале 10 пс.

#### Список литературы

1. Luduena R. F. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications // *Int. Rev. Cytol.* – 1998. – V. 178. – P. 207–275.
2. McRae T. H. Tubulin post-translational modifications: enzymes and their mechanisms of action // *Eur. J. Biochem.* – 1997. – V. 244. – P. 265–278.
3. Rosenbaum J. Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last // *Curr. Biol.* – 2000. – V. 10. – P. R801–R803.
4. Silflow C. D. Why do tubulin gene families lack diversity in flagellate/ciliate protists? // *Protoplasma.* – 1991. – V. 164. – P. 9–11.
5. Bergel M., Herrera J. E., Thatcher B. J., Prymakowska-Bosak M., Vassilevi A., Nakatani Y., Martin B., Bustin M. Acetylation of novel sites in the nucleosomal binding domain of chromosomal protein HMG-14 by p300 alters its interaction with nucleosomes // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 11514–11520.
6. Stanchi F., Corso V., Scannapieco P., Levoletta C., Negrisola E., Tiso N., Lanfranchi G. and Valle G. TUBA8: a new tissue-specific isoform of alpha-tubulin that is highly conserved in human and mouse // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – V. 270. – P. 1111–1118.

7. Sasse R., Gull K. Tubulin post-translational modifications and the construction of microtubular organelles in *Trypanosoma brucei* // J. Cell Sci. – 1988. – V.90. – P. 577–589.
8. Maruta H., Greer K., Rosenbaum J. L. The acetylation of  $\beta$ -tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules // J. Cell Biol. – 1986. – V.103. – P. 571–579.
9. Lindahl E., Hess B., van der Spoel D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis // J. Mol. Modelling. – 2001. – V. 8. – P. 306–317.
10. Ныпорко А.Ю., Блюм Я.Б. Сравнительный анализ вторичной структуры тубулинов и FtsZ-белков // Биополимеры и клетка. – 2001. – Т. 17. – С. 61–69.
11. Guex N., Peitsch M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling // Electrophoresis. – 1997. – V. 18. – P. 2714–2723.
12. Koradi R., Billeter M., Wüthrich K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures // J. Mol. Graphics – 1996. – V. 14. – P. 51–55.

Поступила в редакцию 15.02.2003 г.