

УДК 577.322.7, 543.429.23

*А.П. Якимов, С.О. Федечкин,
К.Б. Нериновский, К.А. Шабалин, С.Л. Смирнов*

СТРУКТУРНАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ ДОМЕНА 6 ВИЛЛИНА В ОТСУТСТВИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ

*A.P. Yakimov¹, S.O. Fedechkin²,
K.B. Nerinovskiy³, K.A. Shabalin⁴, S.L. Smirnov⁵*

^{1,3,4} St. Petersburg State Polytechnical University,
29 Polytechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia.

^{1,2,4} B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute,
Orlova Roscha, Gatchina, 188300, Russia.

³ St. Petersburg State University,
7-9 Universitetskaya Emb., St. Petersburg, 199034, Russia.

^{2,5} Chemistry Department, Western Washington University,
516 High St., Bellingham, WA 98225, USA.

STRUCTURAL STABILITY OF THE VILLIN DOMAIN 6 IN THE ABSENCE OF CALCIUM IONS

Методами гетероядерной ЯМР-спектроскопии исследован вопрос о структурной стабильности домена 6 актинсвязывающего белка виллина в отсутствие ионов кальция. Показано наличие стабильной структуры и выдвинуто предположение об отличии данной трехмерной структуры домена от таковой в присутствии ионов кальция.

ВИЛЛИН. ТРЕХМЕРНАЯ СТРУКТУРА. ГЕЛЬЗОЛИН-ПОДОБНЫЕ БЕЛКИ. ИОНЫ КАЛЬЦИЯ. ЯМР.

Using methods of solution heteronuclear NMR spectroscopy we investigate the structural stability of domain 6 of actin-binding protein Villin (V6) in the absence of calcium ions. We have demonstrated calcium-free V6 to have a stable tertiary structure that was markedly different from the previously reported solution structure of the calcium-bound domain.

VILLIN. 3D-STRUCTURE. GELSOLIN-LIKE DOMAINS. CALCIUM IONS. NMR.

Виллин — актинсвязывающий белок (95 кД), образующий нековалентные шивки между филаментами актина; он входит в состав семейства гельзолиновых белков [1]. Белки семейства гельзолина регулируют длину филаментов актина посредством

разрыва нековалентно связанных актиновых филаментов. Большинство белков семейства гельзолина включает шесть гомологичных гельзолиновых повторов (домены G1 — G6). Каждый такой домен (~14 кД) состоит приблизительно из 110 аминокислот.

кислотных остатков. Белок виллин также включает шесть таких фрагментов, обозначаемых V1 – V6, которые формируют *N*-концевое гельзолиновое ядро белка. Последовательность гельзолинового ядра виллина гомологична гельзолину на 45 % [2], что подразумевает значительное сходство третичной структуры и объясняет способность виллина разрывать филаменты актина при высоких уровнях концентрации ионов кальция. В отличие от гельзолина, виллин при низких уровнях содержания этих ионов может образовывать нековалентные сшивки между филаментами актина, собирая их тем самым в пучки. Данное функциональное свойство виллина объясняется наличием в последовательности виллина *C*-концевого фрагмента из приблизительно 110 остатков, большая часть которого (приблизительно 70 остатков) образует домен *C*-концевой головки (НР-домен, от англ. headpiece). Именно эта способность виллина – образовывать пучки *F*-актина при низких уровнях содержания кальция и разрывать филаменты при возрастании указанного уровня, отличает его от других представителей гельзолинового семейства и делает белок особенно важным компонентом регуляции размера микровиллы в эпителиальных тканях. Грам-отрицательная бактерия *Shigella flexneri* – один из самых опасных возбудителей дизентерии и шигеллиоза, особенно активно распространяющаяся в очагах гуманитарных катастроф [3], использует способность виллина разрывать актиновые филаменты для инициации процесса дезинтеграции структуры микроворсинок желудка и последующего внедрения этих бактерий в организм млекопитающих [4]. По мере более полного понимания структурно-динамических свойств и механизмов функциональной регуляции виллин сможет служить мишенью для разработки перспективных лекарственных препаратов.

Постановка задачи

Сведения о функциональных особенностях виллина во многом основаны на его сравнительном анализе с гельзолином, структура и функциональные свойства которого регулируются уровнем ионов каль-

ция. Третичная структура гельзолина была определена для неактивного, изолированного белка в отсутствие ионов кальция, а также для *C*- и *N*-концевых фрагментов при наличии кальция и актина. В случае субмикромольных концентраций кальция в растворе полипептид гельзолина свернут в компактную неактивную структуру, в которой короткая *C*-концевая спираль домена G6 помещена внутрь домена G2, предотвращая тем самым взаимодействие домена G2 с *F*-актином (рис. 1). При наличии кальция *C*-концевая спираль (показана серым цветом) домена G6 гельзолина (G6 показан черным цветом) формирует контакт-«защелку» с доменом G2, а длинная спираль (показана черным цветом) домена G6 имеет изогнутую конформацию. Сайт связывания кальция домена G6 обозначен значком ⊕, а сайт связывания *F*-актина домена G2 – черным треугольником. В таком неактивном состоянии длинная α-спираль домена G6 гельзолина имеет необычную изогнутую конформацию. Связывание иона кальция доменом G6 ведет к структурным изменениям последнего: распрямлению изогнутой длинной спирали, высвобождению *C*-концевой короткой спирали от взаимодействия с доменом G2 и конформационному переключению всей молекулы гельзолина из закрытого неактивного в раскрытое активное состояние (см. рис. 1).

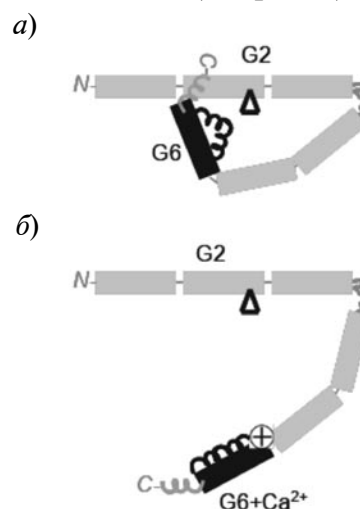


Рис. 1. Диаграмма конформаций гельзолина в отсутствие (а) и при наличии (б) ионов кальция (см. пояснения в тексте)

В противоположность гельзолину виллин имеет меньше известных сайтов связывания кальция [5] и требует более высокой концентрации ионов последнего, порядка 200 мМ, для активирования своей способности разрывать филаменты актина. Такой уровень концентрации кальция не типичен для биологических клеток, но может встречаться в апоптотных клетках. Фосфорилирование определенных остатков тирозина может понижать уровень кальция, необходимый для активирования виллина как белка, разрывающего *F*-актин. Кристаллическая структура виллина до сих пор не определена, и имеющиеся структурные данные для виллина намного более ограничены, по сравнению с таковыми для гельзолина. Гидродинамические и спектроскопические данные показывают, что виллин претерпевает значительные конформационные изменения, вызванные кальцием, с увеличением общей длины молекулы с 84 до 123 Å [6]. Факторы, влияющие на такие изменения, еще не выяснены до конца, но предполагается, что домен *C*-концевой головки ослабляет контакт с гельзолиновым ядром и отдалается от него. Структура домена V1, определенная в растворе [7], демонстрирует основные черты доменов гельзолинового семейства: ядро из пяти β-нитей, расположенное между длинной и двумя короткими α-спиралями. Третичная структура изолированного домена НР была определена и в кристалле, и в растворе. Домен состоит из нескольких α-спиралей, соединенных короткими линкерными последовательностями, и содержит особый сайт связывания *F*-актина, функциональность которого не зависит от уровня кальция. Последние структурно-функциональные данные показывают, что домен V6, возможно, является частью актинсвязывающего фрагмента виллина, который можно отнести к неопisanному ранее типу «структурированный домен – гибкий линкер» (данные готовятся к печати).

Цель данной работы – определение структурной стабильности домена 6 виллина (V6) в растворе в отсутствие ионов кальция.

Предположение о возможной нестабильности структуры домена V6 в отсутствие ионов кальция было высказано в работе [8], где методом ЯМР изучалась динамика остова *C*-концевого фрагмента виллина V6-НР (домен 6, соединенный линкерной последовательностью с доменом НР). В присутствии ионов кальция (5 мМ) фрагмент V6-НР формирует мономер со свернутыми доменами V6 и НР, соединенными неструктурированной линкерной последовательностью. При отсутствии в растворе ионов кальция в ¹⁵N-НСQC-спектре фрагмента V6-НР обнаруживается уменьшение общего количества пиков, увеличение количества пиков в диапазоне 7,9 – 8,6 ppm протонного (¹H) измерения и сохранение позиций большинства пиков, соответствующих НР-домену. Данное наблюдение позволило авторам статьи предположить, что домен V6 может не обладать структурной стабильностью в растворе, лишенном ионов кальция, либо ввиду свойств самого домена, либо в результате влияния линкерной последовательности, соединяющей его с доменом НР [8].

В работе [9] методами рентгеноструктурного анализа была определена кристаллическая структура домена 6 виллина в составе комплекса *F*-актина и фрагментов V4 – V5 – V6 в условиях низкого содержания кальция. Согласно полученным данным установлено, что дифракция происходит только на домене V6, а для доменов V4, V5 и *F*-актина дифракционная картина не позволяет сделать однозначного заключения. Главной особенностью кристаллической структуры V6 при низком содержании кальция является распрямленная конформация длинной спирали домена, а это находится в прямом противоречии с изогнутой длинной спиралью домена 6 гельзолина (G6), наблюдаемой в сходных условиях. Определенная недавно третичная структура домена V6 в растворе, содержащем ионы кальция, (PDB 2LLF, BMRB 18046), имеет длинную спираль в распрямленной конформации, в полном соответствии с конформацией длинной спирали гельзолина в кристаллах с высоким уровнем кальция. Таким образом, на данный момент остается

ся неясным, совпадает ли механизм регуляции ионами кальция перехода в активную форму домена V6, включающий изменение конформации длинной спирали (распрямление), с таковым у домена 6 гельзолина или они существенно различны.

Главная задача данной работы состояла в определении структурной стабильности изолированного домена V6 в растворе, свободном от ионов кальция. Установление экспериментальных условий для сохранения такой стабильности открывает новые возможности и для определения третичной структуры домена V6 в растворе, свободном от ионов кальция, и для изучения механизмов активации белка виллина, основанных на описании конформации длинной спирали домена V6 (распрямленная или изогнутая) – потенциально ключевого регуляторного элемента белка. Если же удастся установить, что домен V6 не обладает устойчивой третичной структурой в растворе без ионов кальция (согласно гипотезе, выдвинутой в работе [8]), то это может означать принципиальное различие механизмов структурно-функциональной регуляции ионами кальция доменов 6 виллина и гельзолина.

Использованные методы

Экспрессионная плаزمиды для фрагмента V6 была получена путем введения стоп-кодона в плазмиду, кодирующую фрагмент виллина V6-HP [8], с помощью протокола QuikChange (Agilent Technologies, Co., USA). Нарботка фрагмента V6 с примерно 98 %-м обогащением изотопами ^{15}N проводилась в индуцибельной системе экспрессии генов *E. coli* согласно методам, описанным ранее [8]. Получение очищенного препарата рекомбинантного фрагмента V6 проводилось за счет последовательной очистки на хроматографических колонках гель-фильтрации Sephadex-G50 и Superdex-S75. Получение образцов белка, не содержащего ионов кальция, производилось добавлением 20-кратного (по отношению к белку) избытка этилендиаминтетрауксусной кислоты и ее последующим удалением при помощи центрифужных концентраторов. Методы ЯМР-спектроскопии высокого разрешения

были использованы для записи двухмерных (^{15}N -HSQC) и трехмерных (^{15}N -edited NOESY, $\tau_{\text{mix}} = 80$ мс) спектров. Данные ЯМР для домена V6 в присутствии 5 мМ CaCl_2 были записаны на системе Varian Inova, 720 МГц. Данные для V6 в отсутствие ионов кальция были записаны на ЯМР-системе Varian DirectDrive, 700 МГц. Эксперименты проводились в растворе, содержащем 10 % D_2O , 20 мМ PIPES-D18 (pH = 6,8) и температуре 25 °С. Для обработки данных ЯМР использовался пакет программ NMRPipe, для визуализации спектров ЯМР – программа NMRView.

Результаты и их обсуждение

Анализ ^{15}N -HSQC-ЯМР-спектров домена V6 в отсутствие и при наличии ионов кальция (рис. 2) показывает, что оба полипептида структурированы. Спектры для образцов V6, не содержащих кальций, записанные многократно на протяжении месяца, оказались идентичными друг другу, что подтверждает структурную стабильность белкового фрагмента в растворе, свободном от ионов кальция. Количество ^{15}N -HSQC-пиков близко для двух форм V6 : 118 (с кальцием) и 110 (без кальция). Несущественная разница в указанных количествах может объясняться выбранными методическими причинами: величинами уровней отсечения шума. Количество пиков в спектрах ^{15}N -HSQC для V6 соответствует наличию единственной конформации данного полипептида, состоящего из 107 аминокислотных остатков (шести пролинов). При этом расположение данных пиков уникально для каждого спектра (см. рис. 2, а, б), что может указывать на значительные различия в третичной структуре фрагмента V6 в присутствии и в отсутствие ионов кальция. Количество ^{15}N -HSQC-пиков в диапазоне 7,9 – 8,6 ppm для ^1H -измерения позволяет оценить потенциальное число неструктурированных аминокислотных остатков. Для обоих образцов V6 (содержащих и не содержащих кальций) это потенциальное число одинаково и равно 37 пикам. Таким образом, можно полагать, что доля неструктурированной полипептидной цепи для V6 в от-

сутствие ионов кальция примерно равна соответствующему параметру в его присутствии. ЯМР-спектры с данными 3D NOESY (рис. 3) содержат примерно равное количество пиков для образцов V6 в присутствии и в отсутствие кальция. Незначительная

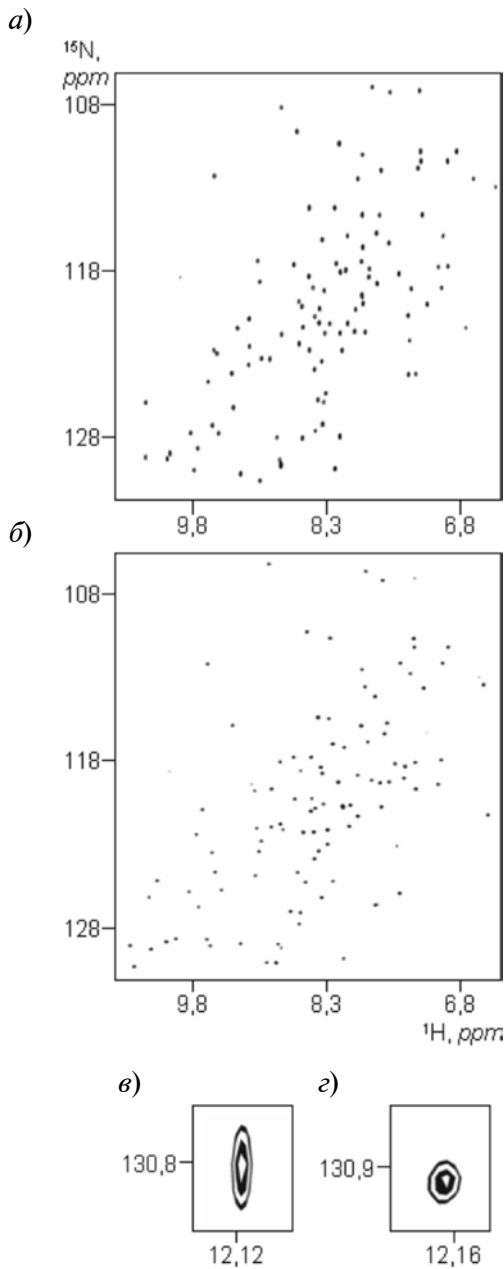


Рис. 2. Спектры ^{15}N -HSQC домена V6 в отсутствие (а) и при наличии (б) ионов кальция; отдельно представлены фрагменты спектров: пик HN-группы 43Trp в отсутствие (в) и при наличии (г) ионов кальция (размер области – $0,10 \times 0,35 \text{ ppm}$)

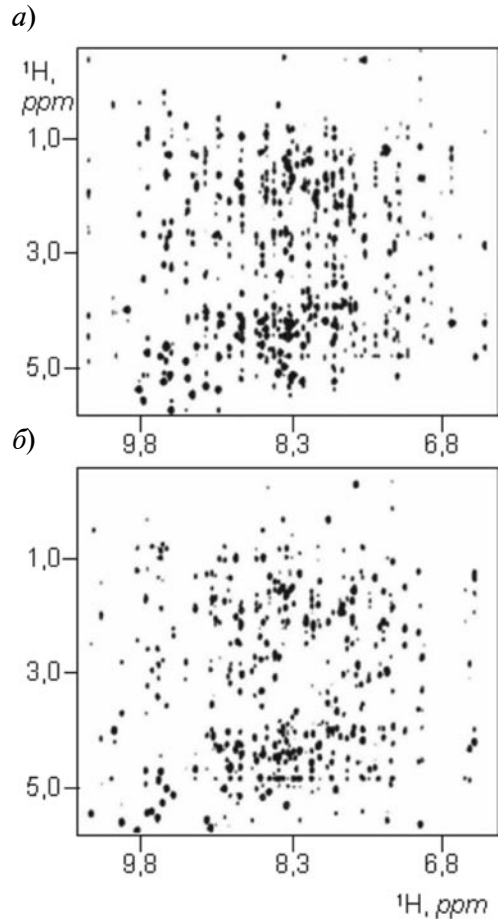


Рис. 3. Спектры 3D NOESY (^{15}N -edited) домена V6 виллина при наличии (а) и в отсутствие ионов кальция (б). Проекция всех ^{15}N -срезов показаны на плоскости $^1\text{H} - ^1\text{H}$

разница между данными величинами (примерно 12 %), как и в случае со спектрами ^{15}N -HSQC, объясняется разной чувствительностью результатов подсчета пиков к выбору уровня отсечения шума. Общая близость количества NOESY-пиков для двух образцов V6 (содержащих и не содержащих кальций) свидетельствует о сходных значениях плотности упаковки полипептидной цепи в двух случаях. Поскольку домен V6 в присутствии ионов кальция образует однодоменную пространственную структуру (PDB 2LLF), можно заключить, что домен V6 в отсутствие ионов кальция также имеет однодоменную пространственную структуру. Дополнительное подтверждение данному заключению обеспечивает

очень близкое положение пиков ^{15}N -HSQC для боковой цепи аминокислоты 43Trp в образцах V6 с кальцием (BMRB 18046, рис. 2, *г*) и без него (рис. 2, *в*). В обоих случаях данный пик располагается на значительном удалении от остальных сигналов (примерно 12,2 ppm в ^1H -измерении), что позволяет использовать его соотношение в спектре образца с кальцием (BMRB 18046) для спектра образца без кальция (рис. 2, *в*). Разница величин химических сдвигов для этого пика в растворах, содержащих ионы кальция и не содержащих таких ионов, оказывается незначительной.

В заключение следует представить основной вывод: в растворе, свободном от ионов кальция, изолированный домен 6 виллина формирует устойчивую однодоменную пространственную структуру. Такая структура, по всей видимости, существенно отличается от пространственной структуры доме-

на V6 при наличии ионов кальция. Таким образом, получает обоснование работа по определению пространственной структуры домена V6 в растворе в отсутствие ионов кальция и по описанию в ней конформации длинной α -спирали (изогнутая или распрямленная) — ключевого элемента регуляции виллина.

Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр нано- и биотехнологий ГОУ СПбГПУ» на базе ФГБОУ ВПО «СПбГПУ» при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 14.В37.21.1230. ЯМР-данные для образца V6 в присутствии ионов кальция были зарегистрированы с использованием оборудования, предоставленного National High Magnetic Field Laboratory, Florida State University, Tallahassee, FL, USA и обеспеченного финансовой поддержкой по договору с National Science Foundation Cooperative Agreement No. DMR-0654118 между штатом Флорида и U.S. Department of Energy. Данная работа была также поддержана грантом, предоставленным M.J. Murdock Charitable Trust (США).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Bretscher, A.** Villin is a major protein of the microvillus cytoskeleton which binds both G and F actin in a calcium-dependent manner [Text] / A. Bretscher, K. Weber // *Cell.* — 1980. — Vol. 20. — P. 839–847.
2. **Finidori, J.** *In vivo* analysis of functional domains from villin and gelsolin [Text] / J. Finidori, E. Friederich, D.J. Kwiatkowski, D. Louvard // *J. Cell. Biol.* — 1992. — Vol. 116. — P. 1145–1155.
3. **Savel'ev, V.N.** Characteristics of dysentery-causing strains isolated from patients and carriers in Republic of South Ossetia during period of humanitarian disaster [Text] / V.N. Savel'ev, B.V. Babenyshev, A.A. Zaitsev [et al.] // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* — 2009. — Vol. 6. — P. 57–59.
4. **Athman, R.** *Shigella flexneri* infection is dependent on villin in the mouse intestine and in primary cultures of intestinal epithelial cells [Text] / R. Athman, M.I. Fernandez, P. Gounon [et al.] // *Cell. Microbiol.* — 2005. — Vol. 7. — P. 1109–1116.
5. **Hesterberg, L.K.** Demonstration of three distinct calcium-binding sites in villin, a modulator of

- actin assembly [Text] / L.K. Hesterberg, K. Weber // *J. Biol. Chem.* — 1983. — Vol. 258. — P. 365–369.
6. **Hesterberg, L.K.** Ligand-induced conformational changes in villin, a calcium-controlled actin-modulating protein [Text] / L.K. Hesterberg, K. Weber // *J. Biol. Chem.* — 1983. — Vol. 258. — P. 359–364.
7. **Markus, M.A.** Refined structure of villin 14T and a detailed comparison with other actin-severing domains [Text] / M.A. Markus, P. Matsudaira, G. Wagner // *Protein. Sci.* — 1997. — Vol. 6. — P. 1197–1209.
8. **Smirnov, S.L.** The isolated sixth gelsolin repeat and headpiece domain of villin bundle F-actin in the presence of calcium and are linked by a 40-residue unstructured sequence [Text] / S.L. Smirnov, N.G. Isern, Z.G. Jiang [et al.] // *Biochemistry.* — 2007. — Vol. 46. — P. 7488–7496.
9. **Wang, H.** Helix straightening as an activation mechanism in the gelsolin superfamily of actin regulatory proteins [Text] / H. Wang, S. Chumnarnsilpa, A. Loonchanta [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2009. — Vol. 284. — P. 21265–21269.

ЯКИМОВ Александр Павлович — младший научный сотрудник лаборатории биофизики макромолекул Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова, сотрудник НИИ «НаноБио» Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
yaleks@nanobio.spbstu.ru

ФЕДЕЧКИН Станислав Олегович – студент-магистрант факультета химии Западного университета штата Вашингтон, США.

516 High St., Bellingham, WA 98225, USA_
fedetcs@gmail.com

НЕРИНОВСКИЙ Кирилл Борисович – программист физического факультета Санкт-Петербургского государственного университета, сотрудник НИИ «НаноБио» Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
nerinovski@yandex.ru

ШАБАЛИН Константин Александрович – кандидат физико-математических наук, доцент кафедры биофизики Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
kostya@omrb.pnpi.spb.ru

СМИРНОВ Сергей Львович – кандидат биологических наук, доцент факультета химии Западного университета штата Вашингтон, США.

516 High St., Bellingham, WA 98225, USA_
smirnov@chem.wvu.edu