

Модель укладки мономеров актина в фибрилле

Глякина А.В.^{1,2}, Сурин А.К.², Галзитская О.В.²

¹ИМПБ РАН – филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН, Пуццино, Россия

²Институт белка РАН, Пуццино, Россия

quark777@rambler.ru, ogalzit@vega.protres.ru

С середины 60-х годов XX века предполагается, что фибриллярный актин в клетках эукариот укладывается в двойную спираль. Экспериментальные данные (ограниченный протеолиз, масс-спектрометрический анализ, электронная микроскопия), доступные на сегодняшний день, находятся в разногласии с этим предположением. В данной работе был проведён анализ 135 структур актина кролика, полученных методами рентгеноструктурного анализа и электронной микроскопии на протяжении последних тридцати лет. Из попарного выравнивания и расчёта среднеквадратичного отклонения для этих структур следует, что они очень похожи между собой. Расчёт площади доступной растворителю поверхности областей, составляющих остов актиновой фибриллы, в имеющихся на настоящий момент фибриллярных структурах актина показал, что эти области одинаково доступны растворителю, как и в молекуле мономерного актина. Таким образом, в настоящей работе на основании экспериментальных и теоретических данных предлагается новая модель укладки мономеров актина в фибрилле.

Ключевые слова: актин, мономер, фибриллы, протеолиз, площадь доступной растворителю поверхности.

Model for stacking actin monomers in fibrils

Glyakina A.V.^{1,2}, Surin A.K.², Galzitskaya O.V.²

¹IMPB RAS – Branch of KIAM RAS, Pushchino, Russia

²Institute of Protein Research RAS, Pushchino, Russia

From the mid-60s of the XX century it is assumed that fibrillar actin in eukaryotic cells exists in the form of a double helix. The experimental data (limited proteolysis, mass spectrometric analysis, electron microscopy) available today are in disagreement with this assumption. In this paper, 135 structures of wild rabbit actin obtained by X-ray diffraction and electron microscopy technique over the last thirty years were analyzed. From the pairwise alignment and the calculation of the root mean square deviation for these structures, it follows that they are very similar. Calculation of the accessible surface areas of the regions forming the core of the actin fibril in the currently available fibrillar actin structures showed that these regions are equally accessible to the solvent, as well as monomeric actin. Thus, in this paper, based on experimental and theoretical data, a new model for stacking actin monomers in fibrils is proposed.

Key words: actin, monomer, fibrils, proteolysis, accessible surface area.

1. Введение

Актин является самым распространённым белком в организме эукариот. Аналоги белка актина также были найдены у бактерий [1–5]. В клетке актин может существовать в двух формах: глобулярной (G-актин) и фибриллярной (F-актин). Длина глобулярного актина составляет порядка 375 аминокислотных остатков, а молекулярная масса около 42 кДа. У позвоночных животных, в зависимости от изоэлектрической точки, различают три изоформы актина α , β и γ . α -актины, в основном,

характерны для мышечных клеток, а β и γ -актины – для не мышечных. α -актины в свою очередь делятся ещё на три типа: α -актин гладких мышц, α -актин скелетных мышц и α -актин сердечных мышц.

Переход актина между глобулярной и фибриллярной формами осуществляется под воздействием ионов и актин-связывающих белков [7–10]. Актин участвует во множестве белок-белковых взаимодействий [11–15], что позволяет ему играть важную роль в подвижности клеток и поддержании ими своей формы. Взаимодействие фибриллярного актина с миозином является основой в сокращении мышц.

MCDEDETTAL VCDNGSGLVK AGFAGDDAPR AVFPSIVGRP RHQGVVMVGMG QKDSYVGD EA QSKRGILT LK YPIEHGIITN
WDDMEKIWHN TFYNELRVAP EEHPTLLTEA PLNPKANREK MTQIMFETFN VPAMYVAIQ A VLSLYASGRT TGI VLDSDGDG
VTHNVPIYEG YALPHAIMRL DLAGRDLTDY LMKILTERGY SFVTTAEREI VRDIKEKLCY VALDFENEMA TAASSSSLEK
SYELPDGQVI TIGNERFRCP ETLFQPSFIG MESAGIHETT YNSIMKCDID IRKDYANNV MSGGTTMYPG IADRMQKEIT
ALAPSTMKIK I IAPPERKYS VWIGGSILAS LSTFQQMWIT KQEYDEAGPS IVHRKCF

Рис. 1. Набор пептидов, полученных при гидролизе F-актина протеиназой К.

Считается, что в эукариотах актин полимеризуется в виде двойной спирали [9, 16], а в бактериях в виде одиночных спиралей и пучков [5].

2. Материалы и методы

2.1. База данных

Список структур белка актина, имеющих в банке белковых структур (Protein Data Bank, <https://www.rcsb.org>) был взят из базы данных UniProtKB (<https://www.uniprot.org>), номер записи P68135, ген ACTA1, вид дикий кролик (*Oryctolagus cuniculus*).

На 01.01.2018 в UniProtKB было 135 структур, одна из которых состояла только из одних Ca-атомов (1ALM). В дальнейшем эта структура была исключена из рассмотрения. Из оставшихся 91 структура была получена методом рентгеноструктурного анализа (X-ray) с разрешением от 1.29 до 7.88 Å, 41 структура – методом электронной микроскопии (EM) с разрешением от 3.6 до 70 Å, одна структура – методом дифракции волокон с разрешением 3.3 Å. И одна модельная структура – 1UY5.

2.2. Структурные характеристики

Попарное пространственное выравнивание 134 структур актина, расчёт среднеквадратичного отклонения (RMSD) по Ca-атомам для каждой пары наложенных структур и расчёт площади доступной растворителю поверхности (ASA) для каждого аминокислотного остатка в структурах актина был проведен с помощью программы YASARA [17]. Если в pdb-файле было несколько структур актина, то для пространственного выравнивания и расчёта RMSD бралась только одна (первая) структура.

2.3. ВЭЖХ-масс-спектрометрический анализ

Для полимеризации актина к образцу добавляли раствор KCl до конечной концентрации 0.1 М и инкубировали при 37 °С в течение суток. Затем препарат, содержащий фибриллярную форму актина, центрифугировали 20 минут при 10600 g. Осадок дважды промывался 100 мМ NH₄HCO₃ (рН 7.5). Осажденные таким образом фибриллы растворяли в 100 мМ NH₄HCO₃ (рН 7.5) до концентрации 1 мг/мл и инкубировали 20 часов с протеиназой К из расчета актин / протеаза = 25/1). К

смеси добавляли раствор CaCl₂ до концентрации 5 мМ для эффективной работы протеиназы К. После инкубирования со смесью протеаз раствор центрифугировали 20 минут при 10600 g, дважды промывали 100 мМ NH₄HCO₃ (рН 7.5), а затем 0.1 % трифторуксусной кислотой (ТФУ). После этого образец высушивался в вакуумном концентраторе (Eppendorf, Германия). Масс-спектрометрический анализ фракций проводили на масс-спектрометре высокого разрешения типа орбитальной ловушки Orbitrap Elite ETD (Thermo Scientific, Германия). Фрагментация ионов проводилась методами активирования соударений (ДАС) и переносом электрона (ПЭ). Массу ионов регистрировали с разрешением 240000, массу фрагментов ионов – 60000. Полученные спектры фрагментации обрабатывались с помощью программы PEAKS Studio 7.5 (Bioinformatics Solution Inc.). Значимыми считались пептиды, интенсивность сигнала которых по ионному току превышала 10⁵.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Определение участков актина, образующих остов фибриллярной структуры

Мономерный актин, выделенный из скелетных мышц кролика, был переведён в фибриллярное состояние путём добавления KCl [15]. Методом ограниченного протеолиза и масс-спектрометрического анализа были определены защищённые от воздействия протеазы участки в структуре фибриллярного актина [15]. Таким образом, экспериментальные данные по обработке F-актина протеиназой К позволили определить аминокислотные остатки, составляющие остов актиновой фибриллы: 23–35, 97–107, 130–149, 164–195 и 331–339 (рис. 1 и рис. 2). Следует отметить, что участки 130–149 и 164–195 являются амилоидогенными по предсказаниям программы FoldAmyloid [18].

Логично предположить, что площадь доступной растворителю поверхности для этих участков в фибрилле, должна быть меньше, чем в одиночной молекуле актина.

Таким образом, этот параметр был рассчитан для мономерной структуры актина (2zwh) и фибриллярной (2w49), состоящей из 16 структур (рис. 3).

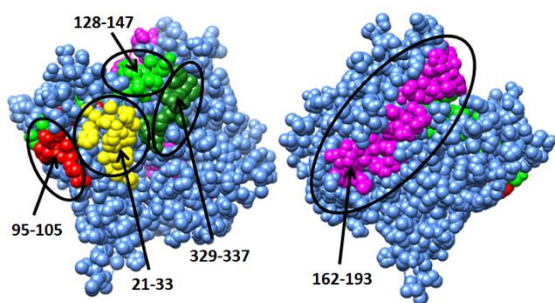


Рис. 2. Участки актина (21–33, 95–105, 128–147, 162–193 и 329–337), которые должны быть защищены в фибрилле, показаны на структуре мономера актина (сдвиг в нумерации произошёл из-за отсутствия в структуре 2zwh первых двух остатков).

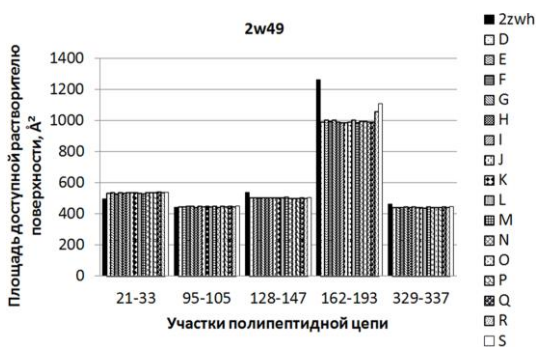


Рис. 3. Площадь доступной растворителю поверхности для участков 21–33, 95–105, 128–147, 162–193 и 329–337 в мономерной (2zwh) и фибриллярной (2w49) структурах актина.

3.2. Анализ структур актина, имеющих в банке белковых структур

Попарное пространственное выравнивание 134 структур актина показало, что RMSD, рассчитанный по $\text{C}\alpha$ -атомам для этих пар не превышает 3 Å (0–1 Å для 4701 пары, 1–2 Å – 3505 пар и 2–3 Å – 704 пар из 8911 пар выровненных структур). Из этого следует, что структуры белка актина дикого кролика (*Oryctolagus cuniculus*) из записи UniProtKB P68135 очень похожи.

Анализ полученных данных показал, что в фибриллярной структуре 2w49 только участок 162–193 меньше доступен растворителю по сравнению с одиночной структурой молекулы актина 2zwh. Разница соответствует одному аминокислотному остатку, для которого, в среднем, площадь доступной растворителю поверхности равна 200 Å². Для остальных участков разница не наблюдается (рис. 3). Из этого следует, что имеющиеся фибриллярные структуры актина не удовлетворяют экспериментальным данным по обработке F-актина протеиназой K.

3.3. Конструирование укладки мономеров в фибрилле актина

Тогда, нами были сделаны две модели укладки актина в фибрилле, таким образом, чтобы участки,

которые входят в остов фибриллы, были как можно меньше доступны растворителю. Эти модели были обозначены как «круг» и «спираль» (рис. 4). Каждая из этих моделей состоит из 10 структур актина. В качестве строительной единицы была взята структура 2zwh.

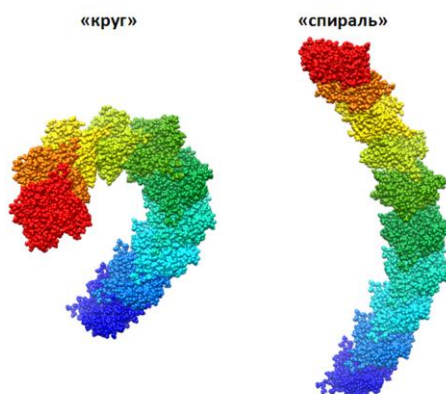


Рис. 4. Модели укладки структуры актина в фибрилле: «круг» и «спираль».

Для полученных моделей также была рассчитана площадь доступной растворителю поверхности для этих участков.

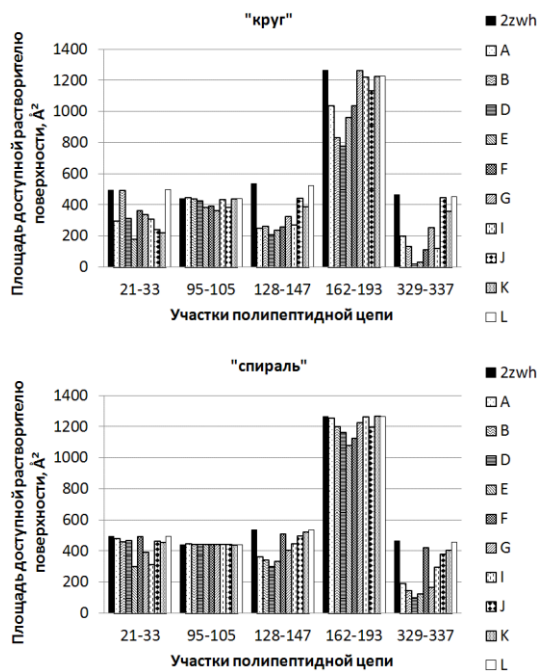


Рис. 5. Площадь доступной растворителю поверхности для участков 21–33, 95–105, 128–147, 162–193 и 329–337 в моделях «круг» и «спираль».

Из рисунка 5 видно, что для структуры «круг» наблюдается уменьшение площади доступной растворителю поверхности на участках 128–147, 162–193 и 329–337 по сравнению с мономерной структурой актина 2zwh. А для модели «спираль» только на участках 128–147 и 329–337.

Из приведённых выше расчётов следует, что модель типа «круг» больше соответствует экспериментальным данным по обработке F-актина протеиназой K, чем модель типа «спираль». При

этом модель типа «круг» противоречит экспериментальным данным по электронной микроскопии (не опубликовано), а модель типа «спираль» согласуется с этими данными.

Таким образом, в данной работе была сделана попытка построить новую модель фибриллярного актина на основании имеющихся новых экспериментальных данных.

4. Благодарности

Актин, выделенный из мышц кролика, был любезно нам предоставлен сотрудниками лаборатории структуры и функции мышечных белков из Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Данная работа поддержана грантом Российского Научного Фонда (№ 18-14-00321).

5. Список литературы

1. Popp D., Narita A., Oda T., Fujisawa T., Matsuo H., Nitana Y., Iwasa M., Maeda K., Onishi H., Maéda Y. Molecular structure of the ParM polymer and the mechanism leading to its nucleotide-driven dynamic instability. *EMBO J.* 2008. V. 27. № 3. P. 570–579. doi: [10.1038/sj.emboj.7601978](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601978).
2. Galkin V.E., Orlova A., Rivera C., Mullins R.D., Egelman E.H. Structural polymorphism of the ParM filament and dynamic instability. *Structure.* 2009. V. 17. № 9. P. 1253–1264. doi: [10.1016/j.str.2009.07.008](https://doi.org/10.1016/j.str.2009.07.008).
3. Popp D., Narita A., Ghoshdastider U., Maeda K., Maéda Y., Oda T., Fujisawa T., Onishi H., Ito K., Robinson R.C. Polymeric structures and dynamic properties of the bacterial actin AlfA. *J. Mol. Biol.* 2010. V. 397. № 4. P. 1031–1041. doi: [10.1016/j.jmb.2010.02.010](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.02.010).
4. Colavin A., Hsin J., Huang K.C. Effects of polymerization and nucleotide identity on the conformational dynamics of the bacterial actin homolog MreB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 9. P. 3585–3590. doi: [10.1073/pnas.1317061111](https://doi.org/10.1073/pnas.1317061111).
5. Barkó S., Szatmári D., Bódis E., Türmer K., Ujfalusi Z., Popp D., Robinson R.C., Nyitrai M. Large-scale purification and in vitro characterization of the assembly of MreB from *Leptospira interrogans*. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1860. № 9. P. 1942–1952. doi: [10.1016/j.bbagen.2016.06.007](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.06.007).
6. Rohr G., Mannherz H.G. Isolation and characterization of secretory actin .DNAase I complex from rat pancreatic juice. *Eur. J. Biochem.* 1978. V. 89. № 1. P. 151–157.
7. Oda T., Iwasa M., Aihara T., Maéda Y., Narita A. The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature.* 2009. V. 457. № 7228. P. 441–445. doi: [10.1038/nature07685](https://doi.org/10.1038/nature07685).
8. Thomasson M.S., Macnaughtan M.A. Microscopy basics and the study of actin-actin-binding protein interactions. *Anal. Biochem.* 2013. V. 443. № 2. P. 156–165. doi: [10.1016/j.ab.2013.09.008](https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.09.008).
9. Dominguez R., Holmes K.C. Actin structure and function. *Annu. Rev. Biophys.* 2011. V. 40. P. 169–186. doi: [10.1146/annurev-biophys-042910-155359](https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155359).
10. Page R., Lindberg U., Schutt C.E. Domain motions in actin. *J. Mol. Biol.* 1998. V. 280. № 3. P. 463–474. doi: [10.1006/jmbi.1998.1879](https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1879).
11. Carlier M.F., Laurent V., Santolini J., Melki R., Didry D., Xia G.X., Hong Y., Chua N.H., Pantaloni D. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J. Cell. Biol.* 1997. V. 136. № 6. P. 1307–1322.
12. Silacci P., Mazzolai L., Gauci C., Stergiopoulos N., Yin H.L., Hayoz D. Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell Mol. Life Sci.* 2004. V. 61. № 19–20. P. 2614–2623. doi: [10.1007/s00018-004-4225-6](https://doi.org/10.1007/s00018-004-4225-6).
13. Kovar D.R., Harris E.S., Mahaffy R., Higgs H.N., Pollard T.D. Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell.* 2006. V. 124. № 2. P. 423–435. doi: [10.1016/j.cell.2005.11.038](https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.038).
14. Ferron F., Rebowski G., Lee S.H., Dominguez R. Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *EMBO J.* 2007. V. 26. № 21. P. 4597–4606. doi: [10.1038/sj.emboj.7601874](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601874).
15. Тихомирова Т.С., Иевлев Р.С., Суворина М.Ю., Бобылева Л.Г., Вихлянец И.М., Сурин А.К., Галзитская О.В. Поиск функционально значимых мотивов и аминокислотных остатков в актине. *Молекулярная биология.* 2018. Т. 52. № 1. С. 136–151. doi: [10.7868/S0026898418010184](https://doi.org/10.7868/S0026898418010184).
16. Huxley H.E. Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J. Mol. Biol.* 1963. V. 7. P. 281–308.
17. Krieger E., Koraimann G., Vriend G. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA- a self-parameterizing force field. *Proteins.* 2002. V. 47. P. 393–402.
18. Garbuzynskiy S.O., Lobanov M.Y., Galzitskaya O.V. FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence. *Bioinformatics.* 2010. V. 26. № 3. P. 326–332. doi: [10.1093/bioinformatics/btp691](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp691).