

О.Н. ДЕМЧУК, А.Ю. НЫПОРКО, Я.Б. БЛЮМ
Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, Киев

ПОСТРОЕНИЕ ТРЕХМЕРНЫХ МОДЕЛЕЙ FtsZ-БЕЛКОВ ARABIDOPSIS THALIANA НА ОСНОВЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ АРХЕБАКТЕРИАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА FtsZ-GDP



Построены трехмерные модели комплексов растительных FtsZ-белков, локализирующихся в цитозоле и хлоропластах, с молекулами ГДФ. В качестве матрицы использовали кристаллическую структуру комплекса FtsZ-GDP из археобактерии *Methanococcus jannaschii* (PDB-код 1FtsZ). Показано, что вторичные структуры смоделированных белков содержат по десять цепей, однако у модели FtsZ-белка внутривнутрихлоропластной локализации имеются десять α - и четыре 3_{10} -спирали, у цитозольного FtsZ-белка наблюдаются девять и три соответствующие структуры и отсутствуют $\alpha 0$ α -спираль перед нуклеотид-связывающим доменом и C-концевая 3_{10} -спираль во вторичном домене. Петля T2 нуклеотид-связывающего кармана хлоропластной формы белка в позиции III содержит незаряженный аланин вместо заряженных остатков, характерных в аналогичной позиции для цитозольного и бактериального белков. При незначительной гомологии последовательностей FtsZ-белков (частичная гомология на уровне 47 %) построенные модели демонстрируют высокий уровень совпадения структуры с матрицей как в области нуклеотид-связывающего кармана, так по всей молекуле в целом и пригодны для дальнейших исследований по выявлению возможных сайтов связывания с динитроанилиновыми гербицидами.

© О.Н. ДЕМЧУК, А.Ю. НЫПОРКО, Я.Б. БЛЮМ, 2006

Введение. Сравнение последовательностей и структурных особенностей про- и эукариотических филаментных белков, ответственных за деление как клеток, так и их органелл — FtsZ-белков и тубулинов, позволяет достаточно легко обнаружить их значительное структурное сходство [1], несмотря на сравнительно низкий уровень гомологии первичных последовательностей [2–5] и наличие ряда отличий в распределении элементов вторичной структуры и их устойчивости во времени [6]. Сходство также распространяется и на некоторые функциональные особенности тубулинов и FtsZ-белков. Оба типа этих белков характеризуются одинаковыми механизмами связывания нуклеотидов, ГТФ-зависимой полимеризации в филаментные структуры [7, 8], однако механизмы свертки у тубулинов и FtsZ-белков существенно отличаются [9]. FtsZ-белки про- и эукариот так же, как и тубулины, структурно более тесно связаны с динуклеотид-связывающими белками (белки со сборкой по Россману), чем с классическими ГТФ-азами, однако образуют новое семейство последних [3]. Известно, что в условиях *in vivo* в составе микротрубочек филаменты тубулина располагаются параллельно друг другу, тогда как молекулярная организация филаментов FtsZ-белков изучена слабо, в то же время оба этих белка формируют трубочки и листы из параллельных или антипараллельных протофиламентов при полимеризации в условиях *in vitro* [10, 11].

Известно, что полимеризация FtsZ-белка из *Mycobacterium tuberculosis* ингибируется в присутствии этил[6-амино-2,3-дигидро-4-фенил-1Н-пиридо (4,3-б) (1,4) диазепин-8-ил] карбамата, являющегося эффективным ингибитором полимеризации тубулина [12]. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что бактериальные FtsZ-белки могут обладать теми же свойствами связывания с антимикротрубочковыми веществами, что и тубулин. Интересно, что такие антимикротрубочковые соединения, как амипрофосметил, представитель фосфоротиоамидов, не только влияет на подвижность растительных пластид, но и изменяет их форму [13]. Следовательно, можно предположить, что последний эффект может быть следствием прямого взаимодействия амипрофосметила с хлоропластными или цитозольными FtsZ-белками.

Поэтому ввиду отмеченного высокого уровня гомологии третичных структур тубулинов и FtsZ-белков логично было бы предположить наличие активности таких важных антимикротрубочковых соединений, как фосфоротиоамиды и динитроанилины [14, 15], и в отношении растительных FtsZ-белков. Поэтому для дальнейшего анализа поверхностей растительных FtsZ-белков, обеспечивающих деление пластид, и локализации мест возможного связывания с указанными гербицидами важно построить корректные трехмерные модели данных белков. Ранее мы уже построили модель цитозольного FtsZ-белка E84778 (код O82533 в базе данных SWISS-PROT), кодирующей в третьей хромосоме *Arabidopsis thaliana* L. [6].

Таким образом, целью настоящей работы было построение трехмерных моделей двух FtsZ-белков разной клеточной локализации — цитоплазматической и хлоропластной. Полученные модели планируется использовать в дальнейших исследованиях по поиску возможных сайтов связывания антимикротрубочковых агентов.

Материалы и методы. Поиск последовательностей FtsZ-белков из *A. thaliana* производился в базе данных Entrez-Protein (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и в дополнение — в базе данных TrEMBL/SWISS-PROT (<http://www.expasy.ch/sprot>) [16]. Найденные нами 17 последовательностей растительных FtsZ-белков были выравнены вместе с FtsZ-последовательностью археобактерии *Methanococcus jannaschii* (код трехмерной структуры в ProteinData банке — 1FsZ, код первичной последовательности в базе данных SwissProt — Q57816) с помощью программы ClustalX 1.81 [17]. Последовательности под номерами NP190843 и AAA82068 из базы данных Entrez-Protein, которые соответствуют FtsZ-белкам, локализирующимся в цитозоле (цитозольный FtsZ-белок) и внутри хлоропластов (хлоропластный FtsZ-белок) соответственно, были отправлены на онлайн-ресурс Swiss Modelling Server [18–20] по адресу <http://www.expasy.ch/swiss-model>. При этом в качестве матрицы для построения моделей использовали кристаллографическую структуру белка 1FsZ [21], так как альтернативная кристаллизованная структура FtsZ-

белка из *Mycobacterium tuberculosis* [22] характеризуется отсутствием значительного числа остатков в различных участках молекулы, так и отдельных атомов углерода, азота и кислорода в боковых цепях.

Информация о совмещенных координатах искомым моделям и матрицы была получена с помощью онлайн-ресурса Swiss Modelling Server. Структура бактериального белка 1FsZ также содержала молекулу ГДФ, координаты которой без изменений были добавлены с помощью текстового процессора в файлы координат обеих соответствующих моделей растительных FtsZ-белков.

Трехмерные структуры комплексов хлоропластного и цитозольного FtsZ-белков с молекулой ГДФ из построенных на Swiss-сервере моделей предварительно помещали в водное окружение с помощью модулей «editconf» и «genbox» программного пакета Gromacs 3.1.4 [23]. Размеры водного окружения, определяемые размерами исследуемых молекул, составляли $6,757 \times 7,642 \times 6,380$ и $6,758 \times 6,718 \times 6,319$ нм для хлоропластного и цитозольного FtsZ-белков соответственно. Оптимизацию геометрии моделей осуществляли путем минимизации энергии с помощью модулей «grompp» и «mdrun» с использованием силового поля ffgmх и алгоритма крутого спуска (steepest descent) при максимальном количестве шагов 1000 и температуре 300 К. Координатный (.gro) и топологический (.itp) файлы для молекулы ГДФ, использующиеся программным пакетом Gromacs в расчетах по оптимизации и молекулярной динамике комплексов FtsZ-ГДФ, были получены с использованием PRODRG-сервера [24].

Визуализацию и структурный анализ оптимизированных трехмерных моделей осуществляли с помощью программ MOLMOL 2k.2 (<http://www.mol.biol.ethz.ch/wuthrich/software/molmol/>) [25] и WebLab ViewerPro 4.0 trial (Molecular Simulations Inc., 2000). Для визуализации вторичной структуры с помощью программы MOLMOL использовали алгоритм DSSP [26]. Карты Рамачандрана-Сасисекхарана [27] и значения RMSD (корня среднеквадратичного отклонения) между матрицей и оптимизированными растительными моделями были получены с помощью программного

пакета Deep View / Swiss-Pdb Viewer 3.7 [28] (<http://www.expasy.org/spdbv/>).

Результаты исследований и их обсуждение. В результате поиска последовательностей FtsZ-белков из *A. thaliana* в базах данных Entrez-Protein, TrEMBL и SWISS-PROT были найдены последовательности 11 цитозольных и 6 хлоропластных FtsZ-белков, обеспечивающих деление пластид. База данных Entrez-Protein содержала 16 интересующих нас последовательностей, в остальных двух базах данных содержалась только одна последовательность, не упоминаемая в Entrez-Protein и помеченная нами приставкой «tr» перед ее идентификационным номером. Указанные последовательности кодируются генами, расположенными на второй и третьей хромосомах в случае цитозольных FtsZ-белков, тогда как в пятой хромосоме находятся все гены FtsZ-белков, транспортируемых после их синтеза в хлоропласты. Они внесены в базу данных Entrez-Protein под номерами: AAK92779, AAM14122, AAD21440, AAC35987, NP565839, NP973612 и E84778 (хромосома 2, 478 остатков), AAN13020, NP190843, trQ9LXJ0 и AAL07180 (хромосома 3, 473 остатка), AAM44944, BAV08597, Q42545, NP200339, AAK59497 и AAA82068 (хромосома 5, 433 остатка).

На рис. 1 представлены все изоформы FtsZ-белков арабидопсиса, а также последовательность FtsZ-белка из архебактерии *M. jannaschii*. Все FtsZ-белки, кодирующиеся генами одной хромосомы, имеют, как правило, идентичные аминокислотные последовательности. Исключениями являются белок E84778, начинающийся с 82 аминокислотного остатка по сравнению с остальными последовательностями, которые кодируются в хромосоме 2, и обозначенный ранее как AtFtsZ2-1 [29]; белок AAL07180, у которого Иле-269 замещен на Асн; белок AAA82068 с остатком Фен-115 вместо Сер, который имеется в остальных последовательностях пятой хромосомы. Уровень полной гомологии всех рассматриваемых нами последовательностей FtsZ-белков составляет только 24 % за счет инвариантных N-концевых участков разной длины и короткой последовательности бактериального белка. Частичная гомология почти в два раза превышает уровень полной гомологии анализируе-

мых последовательностей и составляет 47 %. Поэтому для моделирования нами было отобрано по одной типичной последовательности FtsZ-белков цитозольной и пластидной локализации — NP190843 и AAA82068 соответственно.

После размещения заказа на трехмерное моделирование на Swiss-сервере белкового моделирования [18, 19] с использованием в качестве матрицы FtsZ-белка метанококка [21] сервером были построены модели длиной 319 аминокислотных остатков в случае хлоропластного белка и длиной в 321 остаток для цитозольного белка. На рис. 2, а, б представлены оптимизированные с помощью программного пакета Gromacs третичные структуры моделей растительных FtsZ-белков, содержащие также докированные нами вручную молекулы ГДФ, которые добавляли в нуклеотид-связывающий сайт каждого из белков для более корректной оптимизации вышеуказанной структуры (на рисунке не приводятся). Для сравнения на рис. 2, в изображена третичная структура кристаллографической модели архебактериального FtsZ-белка, использованного в качестве матрицы. Схематическое наложение C_α-цепей растительного (модель) и бактериального (матрица) FtsZ-белков показано на рис. 2, г, д. Результаты такого наложения демонстрируют очень высокую степень структурного сходства между исследуемыми белками несмотря на довольно низкий уровень гомологии их первичных последовательностей (рис. 1).

Построенные модели растительных FtsZ-белков, представленные на рис. 2, имеют такой же тип упаковки, что и архебактериальный белок деления, который, более того, является консервативным для всех представителей тубулинового надсемейства белков. Общая центральная часть молекул всех трех белков состоит из двух доменов, формирующихся β-складкой, которая окружена как α-, так и 3₁₀-спиралями. Перед нуклеотид-связывающим доменом в структуре хлоропластного FtsZ-белка находится небольшая α-спираль α0, присутствующая также в кристаллической структуре матрицы, но отсутствующая в структуре цитозольного белка.

Нуклеотид-связывающий домен FtsZ-белков эукариот включает в себя спирали Н1—Н6

AtFtsZ AAL07180	MAAYVSPCLTTPDGRVLTVLRKSVLPDHLGTRVGLRMSGGTTRKRVVASHKYESSSIRNSLSHSTSHFQSDQDFLNHLHPEISML-----NPR 91
AtFtsZ NP190843	MAAYVSPCLTTPDGRVLTVLRKSVLPDHLGTRVGLRMSGGTTRKRVVASHKYESSSIRNSLSHSTSHFQSDQDFLNHLHPEISML-----NPR 91
AtFtsZ NP973612	MATVYSPCLTTPDGRVLTVLRKSVLPDHLGTRVGLRMSGGTTRKRVVASHKYESSSIRNSLSHSTSHFQSDQDFLNHLHPEISML-----NPR 95
AtFtsZ E84778	-----MLRGGEGTSTIVNPR 14
AtFtsZ NP200339	-----MAIIFLAQLNELTISSSSSSFLTKS-----ISSHLSHSSCICASSR-----ISQFRG-----GFS 50
AtFtsZ AAA82068	-----MAIIFLAQLNELTISSSSSSFLTKS-----ISSHLSHSSCICASSR-----ISQFRG-----GFS 50
MjFtsZ1	-----MKFLKNVLEEGSK-----L 14
AtFtsZ AAL07180	KETSSVPIEDLDLSTPNTYNEARIIVIGVGGGSSAVNVRMISEMIQVEFIWNTIQAMRISPVFPDNRLOIGKELTRGLGAGGNPEIGMNAATESK 191
AtFtsZ NP190843	KETSSVPIEDLDLSTPNTYNEARIIVIGVGGGSSAVNVRMISEMIQVEFIWNTIQAMRISPVFPDNRLOIGKELTRGLGAGGNPEIGMNAATESK 191
AtFtsZ NP973612	KETSSGPVVEDFEPSAPSNYNEARIIVIGVGGGSSAVNVRMISEMSGVEFIWNTIQAMRMSVPLP DNRLOIGKELTRGLGAGGNPEIGMNAATESK 195
AtFtsZ E84778	KETSSGPVVEDFEPSAPSNYNEARIIVIGVGGGSSAVNVRMISEMSGVEFIWNTIQAMRMSVPLP DNRLOIGKELTRGLGAGGNPEIGMNAATESK 114
AtFtsZ NP200339	KRRSDSTRKSMRLRCSFSPMSARIIVIGVGGGSSAVNVRMISGLQSVDFYAINDSQALLQFS--AENPLOIGELLTRGLTGGNPLIGEQAAEESK 148
AtFtsZ AAA82068	KRRSDSTRKSMRLRCSFSPMSARIIVIGVGGGSSAVNVRMISGLQSVDFYAINDSQALLQFS--AENPLOIGELLTRGLTGGNPLIGEQAAEESK 148
MjFtsZ1	EEFNELELSPEDKELLEYLQOTKAKITVVGCGGAGNNTITRILKMGIEGAKTVAINTDAQQLIRTK--ADKKIILIGKKLITRGLGAGGNPKIGEPAAKESA 112
AtFtsZ AAL07180	EAIQEAALYGSDMVFTAGMGGGTGTCGAPIIAGVAKAMGITLVGIVTTPFSEGRRRALQCEGLAMIRDNVDTLIIVPNDKIELAAVSSQSTPVTEAFNIA 291
AtFtsZ NP190843	EAIQEAALYGSDMVFTAGMGGGTGTCGAPIIAGVAKAMGITLVGIVTTPFSEGRRRALQCEGLAMIRDNVDTLIIVPNDKIELAAVSSQSTPVTEAFNIA 291
AtFtsZ NP973612	EVIIEEALYGSDMVFTAGMGGGTGTCGAPIIAGVAKAMGITLVGIAITPFPFEGRRRTVQCEGLASIRDNVDTLIIVPNDKIELAAVSSQSTPVTEAFNIA 295
AtFtsZ E84778	EVIIEEALYGSDMVFTAGMGGGTGTCGAPIIAGVAKAMGITLVGIAITPFPFEGRRRTVQCEGLASIRDNVDTLIIVPNDKIELAAVSSQSTPVTEAFNIA 214
AtFtsZ NP200339	DAI ANALKGSDIIVITAGMGGGTGSEAPVAQISKDAGYITVGVVYTPFSEGRKRSLQALEAIKIQRNVDTLIIVPNDRLDIADEQTFLODAFLIA 248
AtFtsZ AAA82068	DAI ANALKGSDIIVITAGMGGGTGSEAPVAQISKDAGYITVGVVYTPFSEGRKRSLQALEAIKIQRNVDTLIIVPNDRLDIADEQTFLODAFLIA 248
MjFtsZ1	EEI KAIYQDSENVFITCGIIGGGTGTGSAFVVAEISKKI@ALTVAVVTLPEVPEKGVEMRNAMEGLERLKOHTDTLIVIPNERLFEIIVPN-MPLKILAFKVA 211
AtFtsZ AAL07180	DDILRQGVRGISDIIITIPGLVNVDFADVRAIMANAGSSLMGIGTATGKTRARDAALNAIQSPILDIGIEPATEIVVNIITGSSDITLFEVNAAAAEVIYDLV 391
AtFtsZ NP190843	DDILRQGVRGISDIIITIPGLVNVDFADVRAIMANAGSSLMGIGTATGKTRARDAALNAIQSPILDIGIEPATEIVVNIITGSSDITLFEVNAAAAEVIYDLV 391
AtFtsZ NP973612	DDILRQGVRGISDIIITIPGLVNVDFADVRAIMANAGSSLMGIGTATGKSRARDAALNAIQSPILDIGIEPATEIVVNIITGSSDITLFEVNAAAAEVIYDLV 395
AtFtsZ E84778	DDILRQGVRGISDIIITIPGLVNVDFADVRAIMANAGSSLMGIGTATGKSRARDAALNAIQSPILDIGIEPATEIVVNIITGSSDITLFEVNAAAAEVIYDLV 314
AtFtsZ NP200339	DDVLRQGVQGISDIIITIPGLVNVDFADVRAIMANAGSSLMGIGTATGKSRARDAALNAIQSPILDIGIEPATEIVVNIITGSSDITLFEVNAAAAEVIYDLV 348
AtFtsZ AAA82068	DDVLRQGVQGISDIIITIPGLVNVDFADVRAIMANAGSSLMGIGTATGKSRARDAALNAIQSPILDIGIEPATEIVVNIITGSSDITLFEVNAAAAEVIYDLV 348
MjFtsZ1	DEVLINAVKGLVELITKNGIINVDADVKAIVNNGGLAMIGIGESDSEKRAKEAVSMILNSPLILDVDIDGATGALIHVMGPEITLFEAREVAVATVYSRL 311
AtFtsZ AAL07180	DPTANLIFGAVVDPYSYSGQISITLIATGFKROEGEGEGRDQATQADAS-MGATRRPSS-SFTEGSSIEIPEFLKKGKRSRYPRI- 473
AtFtsZ NP190843	DPTANLIFGAVVDPYSYSGQISITLIATGFKROEGEGEGRDQATQADAS-MGATRRPSS-SFTEGSSIEIPEFLKKGKRSRYPRI- 473
AtFtsZ NP973612	DPTANLIFGAVVDPALSGQVITLIATGFKROEGEGEGRVQMVQADAAASVQATRRPSS-SFREGSSVEIPEFLKKGKRSRYPRI- 478
AtFtsZ E84778	DPTANLIFGAVVDPALSGQVITLIATGFKROEGEGEGRVQMVQADAAASVQATRRPSS-SFREGSSVEIPEFLKKGKRSRYPRI- 397
AtFtsZ NP200339	DPSANLIFGAVVDRYTGHEHTVITATGFSQSFQKTLTDPRAAKLLDKMSSGQENKGMISLPHQKQSFSTIISKSSSPRRLFF 433
AtFtsZ AAA82068	DPSANLIFGAVVDRYTGHEHTVITATGFSQSFQKTLTDPRAAKLLDKMSSGQENKGMISLPHQKQSFSTIISKSSSPRRLFF 433
MjFtsZ1	DFNATIIWGATIDENLENTVVRVLLVIFGVQSRIFETDTGLKRRKLELTGIPKI----- 364

Рис. 1. Выравнивание последовательностей FtsZ-белков арабидопсиса (AtFtsZ) и архебактериального FtsZ-белка (MjFtsZ1), использованного в качестве матрицы. Последовательности смоделированных белков выделены жирным шрифтом, начальный остаток каждой модели подчеркнут, а концевой остаток отмечен двойным подчеркиванием. Серым выделены идентичные остатки для всех последовательностей, дефис соответствует пропуску («провалам») в последовательностях

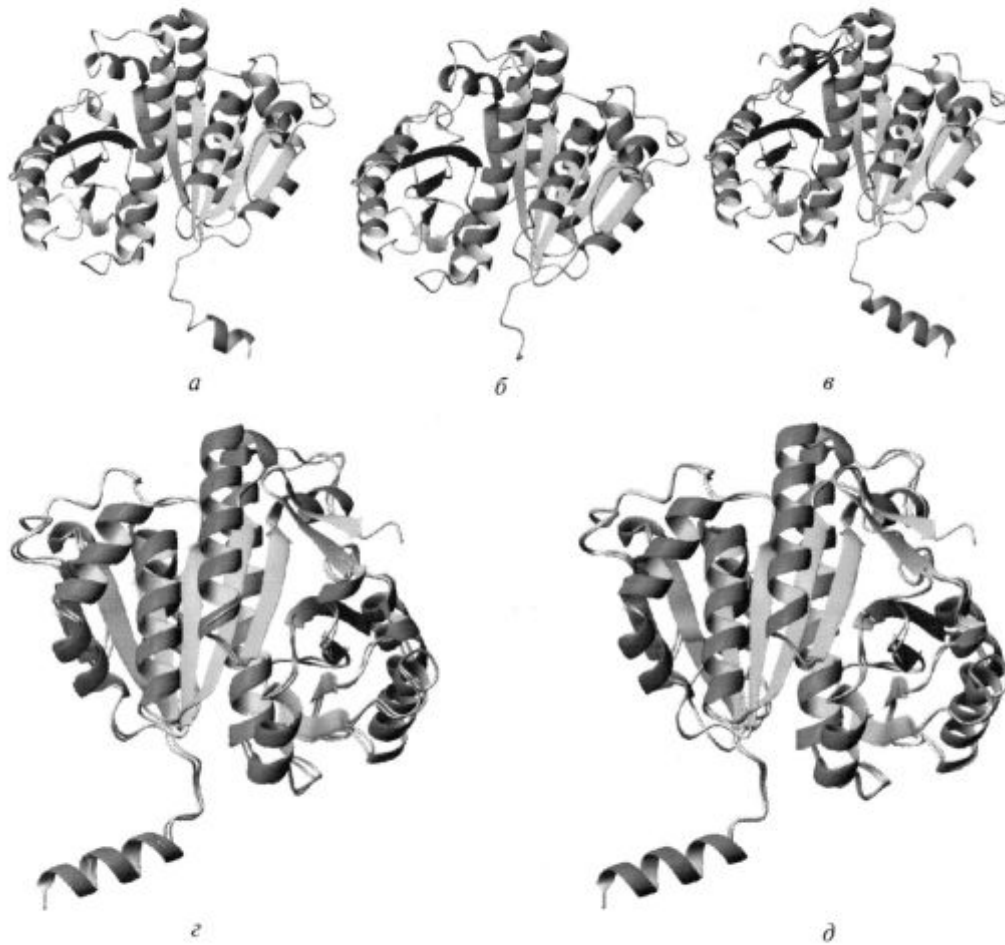


Рис. 2. Трехмерные модели оптимизированных растительных и неоптимизированного археобактериального FtsZ-белков, а также попарно наложенные модели растительного и бактериального белков: *a* — хлоропластная форма белка; *b* — цитозольная форма белка; *c* — бактериальный белок; *e* — наложенные структуры 1Fsz и AAA82068; *d* — наложенные структуры 1Fsz и NP190843. Молекулы ГДФ не показаны. Желто-красные спиральные структуры соответствуют α - и 3_{10} -спиралям, светло-голубые стрелки — β -складкам, серые нити соответствуют неструктурированным участкам. Стрелки показывают ход C_{α} -цепи от N- к C-концу. Сгенерировано в программе MOLMOL 2k.2 [25]

(a1—a6 на рис. 3) и складки S1—S6 (b1—b6 на рис. 3), которые формируют шестискладчатый параллельный β -лист, окруженный с обоих концов спиралью, что соответствует ранее построенным моделям [3, 6]. В отличие от остальных спиралей данного домена спираль ab является не α -, а длинной 3_{10} -спиралью. Согласно параметрам построенных моделей этот домен также содержит еще одну небольшую 3_{10} -спираль в T5-петле между структурами b5 и a5, что распространяется и на структуру бактериального белка, визуализированную по алгоритму программы DSSP [26]. С помощью коровой спирали H7 (a7 на рис. 3) к данному

домену присоединен вторичный домен меньшего размера, состоящий из спиралей H8—H10 (a8—a10 на рис. 3) и складок S7—S10 (b7—b10 на рис. 3), которые образуют четырехскладчатый, главным образом параллельный, β -лист с двумя спиралью с одной стороны и одной спиралью — с другой. В построенных нами моделях в данном домене располагаются также еще и короткие 3_{10} -спирали: между a9- и b8-элементами у обоих растительных белков и после b10-элемента в случае хлоропластного FtsZ-белка. Петлевые участки T1—T7 непосредственно вовлечены в связывание нуклеотидов [3].

Следует отметить незначительные отличия между оптимизированной структурой нуклеотид-связывающих доменов растительных FtsZ-белков и структурой аналогичного домена бактериального FtsZ-белка, приведенного в работе [3]. Так, в наших моделях отсутствуют петли T1 и T6 между b1—a1- и b6—a6-элементами структуры соответственно — остатки, которые должны их формировать, входят в состав последующих спиралей; петля T5 прерывается короткой 3_{10} -спиралью. Это обуславливается различием в степени оптимизации белковых моделей перед их визуализацией — кристаллограммы зачастую не подвергаются оптимизации вообще. Кроме того, описанные отличия укладываются в рамки метастабильности элементов вторичной структуры. Однако конформация самих C_{α} -цепей как FtsZ-белка метанокока, так и смоделированных нами белков в значительной степени совпадает.

N- и C-концевые участки матрицы и разработанных моделей FtsZ-белков арабидопсиса также имеют некоторые отличия. В то время как структура бактериального FtsZ-белка имеет в N-области длинную дополнительную α -спираль (a0 на рис. 3), у хлоропластного FtsZ-белка данная спираль короче более чем в два раза, а у цитозольного белка она отсутствует вообще. На C-конце FtsZ-белок метанококка имеет маленькую β -шпильку (b11-b12), однако в структуре растительных белков она отсутствует. Вторичный домен обоих смоделированных FtsZ-белков имеет дополнительные 3_{10} -спирали (рис. 3).

Величина RMSD для 319 наложенных C_{α} -атомов структур белков 1FsZ и AAA82068 равняется $2,32 \text{ \AA}$, а для 321 наложенного C_{α} -атома структур белков 1FsZ и NP190843 — $6,38 \text{ \AA}$. Следует отметить, что с помощью метода «первого приближения» при использовании программы ProMod II было смоделировано тысячи последовательностей белков с известными структурами [20, 30—32]. При этом для 78 и 86 % последовательностей, идентичных на 40—49 и 50—59 % со своими матрицами, генерировались модели, RMSD которых с матрицами было меньше 4 и 5 \AA соответственно (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL>, достоверные модели). Идентичность последовательностей цитозольного и пластид-

ного FtsZ-белков со своей матрицей составляет 40,1 и 42,8 % соответственно. При этом огромный вклад в столь низкий процент идентичности вносят продолжительные N- и C-концевые участки данных белков. Значение RMSD в $2,32 \text{ \AA}$ для полученной модели пластидного FtsZ-белка по сравнению с матрицей находится в пределах, допустимых при изучении Swiss-моделей. Более значимое отклонение в $6,38 \text{ \AA}$ в случае цитозольного белка обуславливается наличием двух делеций длиной в два (между a2 и b3 структурными элементами) и один (перед элементом a7) остатка в аминокислотной последовательности матрицы (рис. 3).

На рис. 4,а,б представлены карты Рамачандрана, рассчитанные для обеих оптимизированных моделей растительных FtsZ-белков. Данные на этих картах свидетельствуют о том, что 85,9 % из 321 остатка цитозольного и 87,8 % из 319 остатков пластидного FtsZ-белков имеют наиболее оптимальные значения углов внутреннего вращения, так как находятся в областях разрешенных конформаций. В случае модели хлоропластного FtsZ-белка в запрещенных областях карты Рамачандрана остается девять остатков (2,8 % от общего количества остатков в модели): Гли-82, Гли-96, Гли-132, Гли-168, Гли-169, Гли-202, Гли-267, Гли-321 и Тре-365, причем 107-й, 205-й и 303-й остатки прилегают к частично разрешенным областям (рис. 4,а). У модели цитозольного FtsZ-белка в области запрещенных конформаций находятся 11 аминокислотных остатков (3,4 % общей длины построенной модели): Гли-123, Глу-137, Гли-175, Гли-211, Гли-212, Гли-245, Тре-282, Гли-310, Гли-327, Гли-364 и Сер-408, половина из которых располагаются в непосредственной близости от границы участков с напряженной конформацией (рис. 4, б).

На рис. 5,а,б показаны структуры пластидного и цитозольного FtsZ-белков арабидопсиса с молекулой ГДФ в нуклеотид-связывающем центре соответственно, прошедшие процесс минимизации потенциальной энергии данных комплексов. На рис. 5, в представлена структура поверхности неоптимизированного комплекса 1FsZ-ГДФ в той же ориентации, что и в случае растительных комплексов FtsZ-ГДФ. Данные «поверхностные» схемы вторичной структуры свидетельствуют об очень высо-

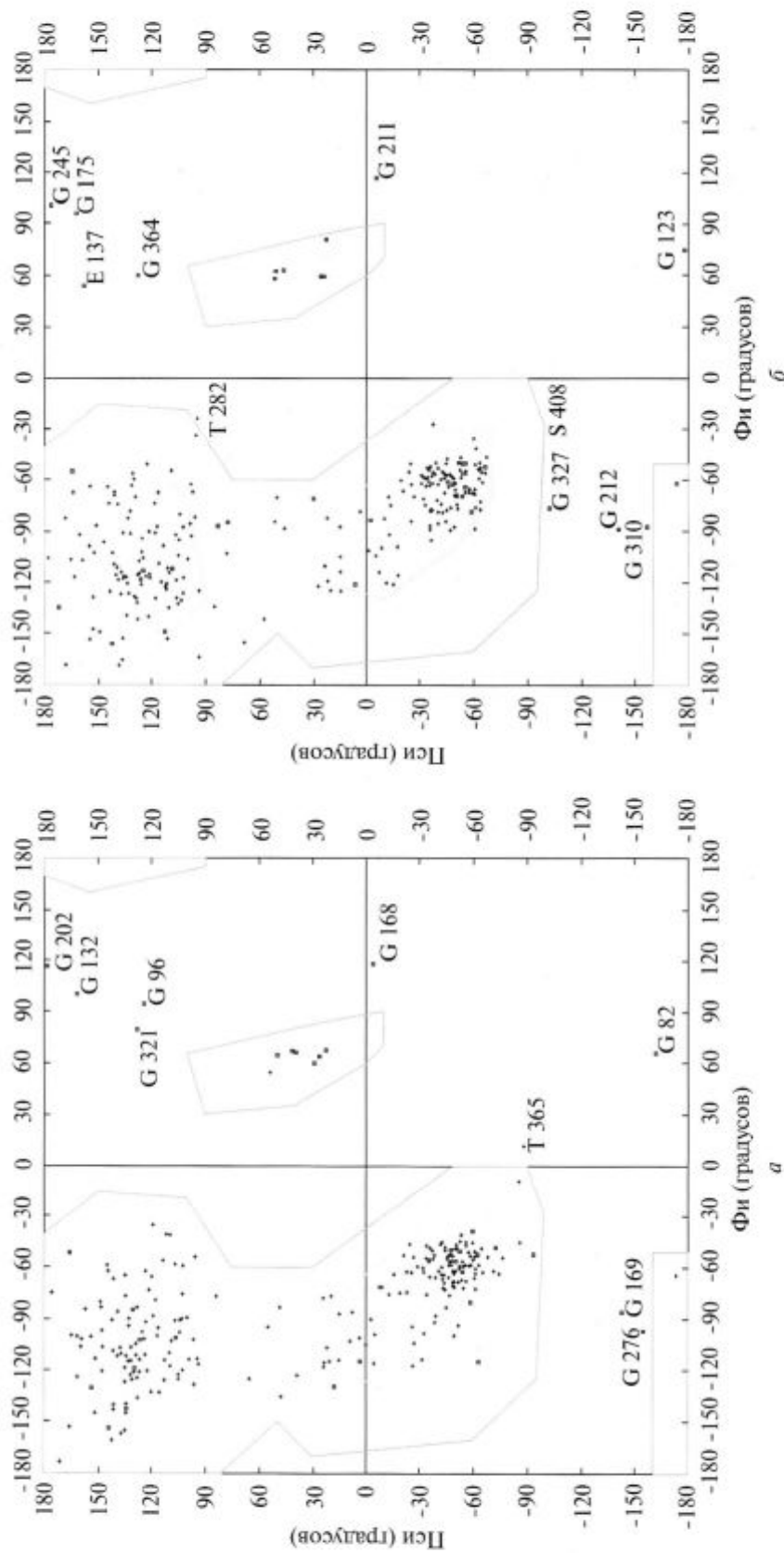


Рис. 4. Карты Рамачандрана для оптимизированных в присутствии молекул ГДФ моделей FtsZ-белков: *a* — хлоропластная форма белка; *б* — цитозольная форма белка. Аминокислоты в запрещенных зонах отмечены однобуквенным индексом с порядковым номером в построенной модели. Желтой линией ограничены зоны полностью разрешенных конформаций, синей линией — напряженных

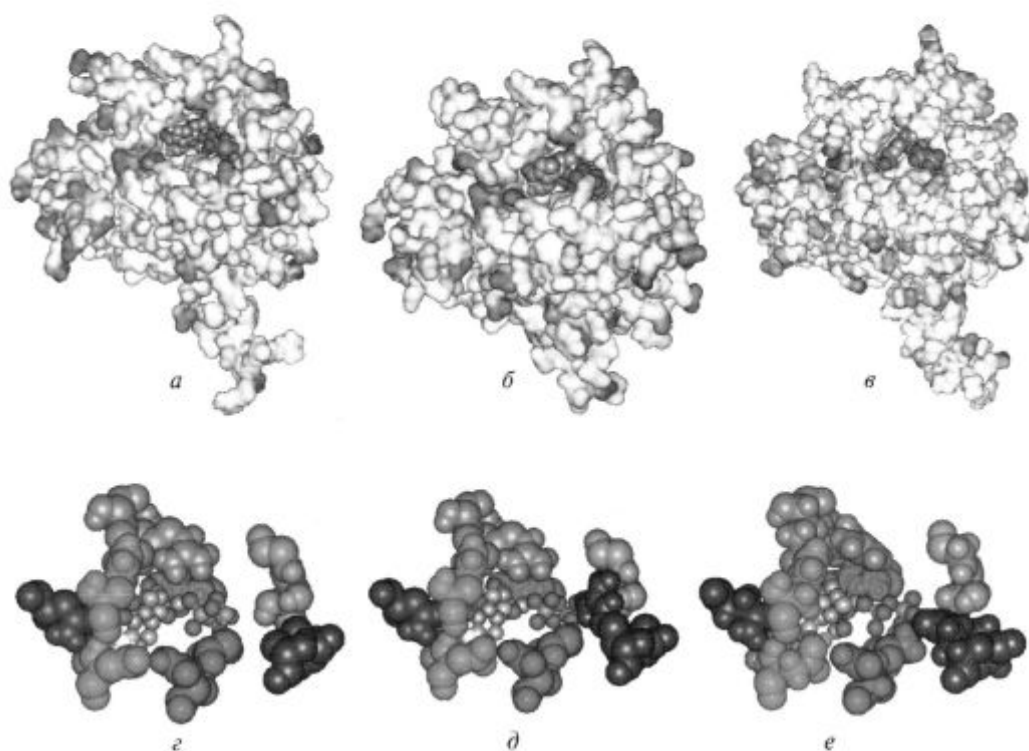


Рис. 5. Сайты связывания молекулы ГДФ в растительных и бактериальном FtsZ-белках (а–в) и аминокислотные остатки, вовлеченные в связывание нуклеотида (г–е): а, г — пластидный белок; б, д — цитозольный белок; в, е — архебактериальный белок-матрица. Растительные комплексы оптимизированы, бактериальный — нет. Белки представлены Ван-дер-Ваальсовой поверхностью, окрашенной согласно электростатическому потенциалу, где красным обозначены кислые зоны, синим — основные, серым — нейтральные. Атомы молекул ГДФ представлены сферами их Ван-дер-Ваальсовых радиусов, окрашенных согласно типу атомов. Аминокислотные остатки, формирующие нуклеотид-связывающие карманы, изображены в виде сфер, представляющих Ван-дер-Ваальсовы радиусы их атомов, и окрашены в однотонный цвет. Молекула ГДФ представлена в виде сфер и цилиндров и окрашена по типу атомов. Красным отмечены аминокислотные остатки в составе петли Т1: г — Гли-83, Асп-87, д — Гли-124, Асп-128, е — Гли-47, Асп-51; коричневым — остатки петли Т2: г — Тре-107, Ала-111, д — Иле-150, Арг-154, е — Тре-71, Гли-75; оранжевым — остатки петли Т3: г — Тре-133, Гли-134, д — Ала-176, Гли-177, е — Ала-97, Гли-98; зеленым — остатки петли Т4: г — Гли-168, Гли-169, Гли-172, д — Гли-211, Гли-212, Гли-215, е — Гли-132, Гли-133, Гли-136; голубым — остатки в составе петли Т5: г — Тре-195, Глу-201, Арг-205, д — Тре-238, Гли-244, Арг-248, е — Тре-159, Глу-165, Арг-169; фиолетовым — остаток в петле Т6: г — Асп-228, д — Асп-271, е — Асп-192; розовым — остатки из α -спирали а7: г — Фен-245, Асп-249, д — Фен-288, Асп-292, е — Фен-208, Асп-212. Сгенерировано в программе WebLab ViewerPro 4.0 trial

ком сходстве локализации лиганда не только в оптимизированных комплексах растительных белков, но и в неоптимизированной структуре бактериального белка-матрицы.

На рис. 5, г–е изображены аминокислотные остатки петель Т1–Т6 и α -спирали а7 в составе пластидного, цитозольного и бактериального FtsZ-белков соответственно, которые тесно контактируют со связанным лигандом. Сравнение нуклеотид-связывающих карманов смоделированных по матрице структур FtsZ-белков (рис. 5, г, д) и экспериментально

установленной с помощью кристаллографии структуры бактериального FtsZ-белка (рис. 5, е) указывает на высокое их сходство, подтверждающее правдоподобие построенных моделей. Во всех трех случаях молекула ГДФ оказывается глубоко погруженной в связывающий карман соответствующих белков, хотя существуют определенные отличия в составе контактных остатков из петель Т2 и Т3 (в Т2-петле — Тре-107, Ала-111; Иле-150, Арг-154; Тре-71, Гли-75; в Т3-петле — Тре-133, Гли-134; Ала-176, Гли-177; Ала-97, Гли-98 соответственно у

белков цитозольной и внутрипластидной локализации и бактериального FtsZ-белка). Следует отметить, что T2-петля хлоропластного белка немного слабее контактирует с фосфатной группой динуклеотида по сравнению с двумя другими FtsZ-белками из-за наличия в своем составе остатка Ала-111, у которого короткая боковая цепь представлена только метильной группой. Состав контактных остатков петель T1, T4-T6 и α -спирали $\alpha 7$ идентичен. В целом для нуклеотид-связывающих карманов в молекулах каждого исследуемого белка характерно наличие 3–4 заряженных аминокислотных остатков (рис. 5, ε – e).

Таким образом, осуществленное моделирование растительных ГДФ-связывающих FtsZ-белков различной клеточной локализации с использованием одной общей матрицы позволяет получить модели с высокой степенью сродства. В качестве такой матрицы использовали доступную кристаллическую структуру комплекса FtsZ-GDP из архебактерии *M. jannaschii*, имеющую идентичность последовательностей с искомыми моделями на уровне 40–42 %. Структурными элементами, которыми отличаются друг от друга построенные модели, являются α -спираль $\alpha 0$, отсутствующая у цитозольного FtsZ-белка, и C-концевая 3_{10} -спираль, присутствующая только у хлоропластного белка. Модели, построенные с использованием в качестве матрицы архебактериального FtsZ-белка, в основном оказались вполне корректными и достоверными. Вторичные структуры обоих пластидных белков деления имели по десять β -цепей и различное количество α - и 3_{10} -спиралей: у модели хлоропластного FtsZ-белка десять α -спиралей и четыре 3_{10} -спирали, у цитозольного белка наблюдали девять и три соответствующих структурных элемента. Нуклеотид-связывающий карман у моделей растительных FtsZ-белков в значительной мере подобен карману матрицы, и только в составе T2-петли хлоропластного FtsZ-белка на месте заряженного и полярного остатка, находящегося в данной позиции у цитозольного и у бактериального белков соответственно, находился незаряженный остаток аланина.

Следовательно, полученные модели хлоропластных белков деления как цитозольной,

так и внутрипластидной локализации вполне пригодны для дальнейших исследований их молекулярной динамики и для поиска возможных сайтов связывания с антимицротрубчочковыми соединениями.

SUMMARY. Three-dimensional models of FtsZ-protein complexes with GDP from *Arabidopsis thaliana* L. localized in cytosol (Entrez database code NP190843) and in chloroplasts (Entrez database code AAA82068) were developed. Crystal structure of the FtsZ-GDP complex from archaea *Methanococcus jannaschii* (PDB-code 1FSZ) was used as a matrix. Secondary structures of computed models contain ten β -strands. A chloroplast form of FtsZ-protein has ten α -helices and four 3_{10} -helices, whereas cytosolic form of protein has nine and three structures correspondently and neither $\alpha 0$ -helix before nucleotide-binding domain nor C-terminal 3_{10} -helix in secondary domain. The T2-loop of nucleotide-binding pocket of chloroplast form of FtsZ-protein in position 111 contains non-charged alanin residue instead of the charged one which is typical for cytosolic and bacterial forms of proteins. At low sequence homology of FtsZ-proteins (approximately 47 %) the developed models demonstrate high coincidence with matrix both in the structures of nucleotide-binding pocket and in the whole molecule. The models are completely suitable for further studies of possible sites of binding with dinitroaniline herbicides.

РЕЗЮМЕ. Побудовано тривимірні моделі комплексів рослинних FtsZ-білків, котрі локалізуються в цитозолі та хлоропластах, з молекулами ГДФ. За матрицю слугувала кристалічна структура комплексу FtsZ-GDP з архебактерії *Methanococcus jannaschii* (PDB-код 1FSZ). Показано, що вторинні структури всіх змодельованих білків мають по десять β -ланцюгів, проте модель FtsZ-білка хлоропластного розміщення має десять α - та чотири 3_{10} -спіралі, тоді як у цитозольної форми спостерігаються дев'ять та три відповідні структури і відсутні $\alpha 0$ α -спіраль перед нуклеотид-зв'язуючим доменом і C-кінцева 3_{10} -спіраль у вторинному домені. Петля T2 нуклеотид-зв'язуючого карману хлоропластної форми білка в позиції 111 містить незаряджений аланін замість заряджених залишків, характерних в даній позиції для цитозольного та бактеріального білків. При незначній гомології послідовностей FtsZ-білків (часткова гомологія на рівні 47 %) побудовані моделі демонструють високий рівень збігу структури з матрицею як в області нуклеотид-зв'язуючого карману, так і по всій молекулі в цілому.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Erickson H.P. Atomic structures of tubulin and FtsZ // Trends Cell Biol. — 1998. — 8. — P. 133–137.

2. *Pereda J.M. de, Leynadier D., Evangelio J.A., Chason P., Andreu J.M.* Tubulin secondary structure analysis, limited proteolysis sites and homology to FtsZ // *Biochemistry*. — 1996. — **35**. — P. 14203–14215.
3. *Nogales E.A., Downing K.H., Amos L.A., Lowe J.* Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases // *Nature Struct. Biol.* — 1998. — **5**. — P. 451–458.
4. Демчук О.Н., Блюм Я.Б. Построение филогенетического древа растительных тубулинов на основании гомологии их белковых последовательностей // *Цитология и генетика*. — 2005. — **39**, № 2. — С. 3–9.
5. Демчук О.Н., Блюм Я.Б. Филогенетическое древо бактериальных и эукариотических FtsZ-белков на основании гомологии их первичных последовательностей // *Цитология и генетика*. — 2005. — **39**, № 4. — С. 3–12.
6. Ныпорко А.Ю., Блюм Я.Б. Сравнительный анализ вторичной структуры тубулинов и FtsZ-белков // *Биополимеры и клетка*. — 2001. — **17**, № 1. — С. 61.
7. *Nogales E.A.* Structural view of microtubule dynamics // *Cell Mol. Life Sci.* — 1999. — **56**. — P. 133–142.
8. *Mukherjee A., Lutkenhaus J.* Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis // *EMBO J.* — 1998. — **17**. — P. 462–469.
9. *Bertrand S., Barthelemy I., Oliva M.A. et al.* Folding, stability and polymerization properties of FtsZ chimeras with inserted tubulin loops involved in the interaction with the cytosolic chaperonin CCT and in microtubule formation // *J. Mol. Biol.* — 2005. — **346**. — P. 319–330.
10. *Lowe J., Amos L.A.* Helical tubes of FtsZ from *Methanococcus jannaschii* // *Biol. Chem.* — 2000. — **381**. — P. 993–999.
11. *Ent F. van den, Amos L., Lowe J.* Bacterial ancestry of actin and tubulin // *Curr. Opin. in Microbiol.* — 2001. — **4**. — P. 634–638.
12. *White E.L., Ross L.I., Reyholds R.C. et al.* Slow Polymerization of *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ // *J. Bacteriol.* — 2000. — **182**. — P. 4028–4034.
13. *Kwok E.Y., Hanson M.R.* Microfilaments and microtubules control the morphology and movement of non-green plastids and stromules in *Nicotiana tabacum* // *Plant J.* — 2003. — **35**. — P. 16–26.
14. Ныпорко А.Ю., Емец А.И., Климкина Л.А., Блюм Я.Б. Взаимосвязь чувствительности каллуса *Eleusine indica* к трифлуралину и амипрофосметилу с особенностями взаимодействия этих соединений с тубулином // *Физиология растений*. — 2002. — **49**. — С. 459–466.
15. *Blume Ya.B., Nyporko A.Yu., Yemets A.I., Baird W.V.* Structural modeling of the interaction of plant α -tubulin with dinitroaniline and phosphoramidate herbicides // *Cell Biol. Int.* — 2003. — **27**. — P. 171–174.
16. *Bairoch A., Apweiler R.* The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL in 2000 // *Nucl. Acids Res.* — 2000. — **28**. — P. 45–48.
17. *Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G.* The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // *Nucl. Acids Res.* — 1997. — **24**. — P. 4876–4882.
18. *Peitsch M.C., Guex N.* Large-scale comparative protein modeling // *Proteome Research : New Frontiers in Functional Genomics* / Eds M.R. Wilkins et al. — Berlin : Springer, 1997. — P. 177–186.
19. *Peitsch M.C.* ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling // *Biochem. Soc. Trans.* — 1996. — **24**. — P. 274–279.
20. *Guex N., Peitsch M.C.* Molecular modeling of proteins // *Immunol. News.* — 1999. — **6**. — P. 132–134.
21. *Lowe J.* Crystal structure determination of FtsZ from *Methanococcus jannaschii* // *J. Struct. Biol.* — 1998. — **124**. — P. 235–243.
22. *Leung A.K.W., White E.L., Ross L.J. et al.* Structure of *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ reveals unexpected, G protein-like conformational switches // *J. Mol. Biol.* — 2004. — **342**. — P. 953–970.
23. *Lindahl E., Hess B., Spoel D. van der.* GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis // *J. Mol. Mod.* — 2001. — **7**. — P. 306–317.
24. *Schuettelkopf A.W., Aalten D.M.F. van.* PRODRG — a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes // *Acta Crystallogr.* — 2004. — **D60**. — P. 1355–1363.
25. *Koradi R., Billeter M., Wuthrich K.* MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures // *J. Mol. Graphics.* — 1996. — **14**. — P. 51–55.
26. *Kabsch W., Sander C.* Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features // *Biopolymers.* — 1983. — **22**. — P. 2577–2637.
27. *Ramachandran G.N., Ramakrishnan C., Sasisekharan V.* Stereochemistry of polypeptide chain conformations // *J. Mol. Biol.* — 1963. — **7**. — P. 95–99.
28. *Guex N., Peitsch M.C.* SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling // *Electrophoresis.* — 1997. — **18**. — P. 2714.
29. *Osteryoung K.W., Stokes K.D., Rutherford S.M. et al.* Chloroplast division in higher plants requires members of two functionally divergent gene families with homology to bacterial FtsZ // *Plant Cell.* — 1998. — **10**. — P. 1991–2004.
30. *Holden C.* High protein-crunch // *Science.* — 1988. — **280**. — P. 1353.
31. *Guex N., Diemand A., Peitsch M.C.* Protein modeling for all // *Trends Biochem. Sci.* — 1999. — **24**. — P. 364–367.
32. *Agaval M., Nelson D.J., Larochelle D.A.* The three-dimensional model of *Dictyostelium discoideum* racE based on the human rhoA-GDP crystal structure // *J. Mol. Graph. and Model.* — 2002. — **21**. — P. 3–18.

Поступила 26.09.05