

*О. В. Ачинович\**, *Е. В. Барковский\**, *В. Г. Цыганков*

## **ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ МОЗГА И ПРОФИЛИ ГИДРОФОБНОГО МОМЕНТА ЕЕ СТРУКТУРИРОВАННЫХ УЧАСТКОВ**

Аденилатциклаза, катализируя образование циклического аденозинмонофосфата из аденозинтрифосфорной кислоты, является ключевым ферментом в сложной цепи трансмембранного переноса регуляторного сигнала с поверхности внутрь клетки. В настоящее время в клетках эукариот доказано наличие шести различных изоформ аденилатциклазы, специфичных по отношению к определенным активаторам и ингибиторам [1]. Известно, что развитие многих физиологических и патологических процессов в органах и тканях организма сопровождается значительными перестройками в их гормональной регуляции на уровне каскада рецептор → G-белок → аденилатциклаза. Естественно, что анализ отдельных стадий структурно-функционального взаимодействия белков этого каскада невозможен без точного знания их структуры. Поэтому в настоящей работе предпринята попытка предсказания вторичной структуры аденилатциклазы мозга и анализа профилей гидрофобного момента ее структурированных участков.

**Материал и методы исследования.** Аденилатциклаза мозга — одна из шести мембраносвязанных изоформ фермента эу-кариотических клеток, состоящая из 1134 аминокислотных остатков [2].

**Предсказание структурированных участков по их аминокислотной последовательности.** Вторичная структура аденилатциклазы мозга предсказывалась по методу [3]. На первом этапе производится предсказание  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -структурных участков. Минимальная длина  $\alpha$ -спиралей была принята равной пяти аминокислотным остаткам, а  $\beta$ -структуры — трем остаткам.  $\beta$ -Поворотами счи-

---

\* Минский государственный медицинский институт.

тались участки аминокислотной последовательности, которые не входили в потенциальные спирали и  $\beta$ -структуры и являлись потенциально  $\beta$ -поворотами. Локализацию  $\beta$ -поворотов проводили с учетом того, что остаток  $\beta$ -поворота  $i$  и  $i + 3$  или оба одновременно могут входить в состав  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -структуры. В том случае, если участок полипептидной цепи характеризуется высоким  $\beta$ -поворотным потенциалом, то он считается  $\beta$ -поворотом независимо от того, «пересекает» ли он  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -структуры. Если в этом случае появляются  $\alpha$ -спирали или  $\beta$ -структуры с длиной, меньшей минимально допустимой для них, то они исключаются из рассмотрения.

#### АЛГОРИТМ ПРЕДСКАЗАНИЯ ТРАНСМЕМБРАННЫХ СЕГМЕНТОВ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ БЕЛКОВ ПО ИХ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

##### 1. Построение профиля гидрофобности белка.

Начиная с  $N$ -конца для последовательного ряда перекрывающихся нонапептидных фрагментов со сдвигом на один аминокислотный остаток, рассчитывается суммарная алгебраическая величина индексов гидрофобности, которая приписывается центральному (пятому) остатку каждого нонапептида.

##### 2. Выделение кандидатов в трансмембранные сегменты.

Используя профиль гидрофобности белка, выделяют участки полипептидной цепи протяженностью около 20 аминокислотных остатков с непрерывающимися положительными значениями суммарной гидрофобности перекрывающихся нонапептидных фрагментов и средним значением индекса гидрофобности (на один аминокислотный остаток) не менее 0,72.

##### 3. Локализация трансмембранных сегментов.

Анализ аминокислотных последовательностей всех кандидатов проводится с учетом того, что трансмембранный сегмент прерывается одним дипептидным фрагментом, состоящим из аминокислотных остатков с отрицательными значениями индексов гидрофобности и их суммарным значением менее  $-2,4$ , а также одним трипептидным фрагментом, состоящим из аминокислотных ос-

татков с отрицательными значениями индексов гидрофобности и их суммарным значением менее -2,9.

В настоящей работе для построения профиля гидрофобности аденилатциклазы мозга использовалась оригинальная шкала гидрофобности аминокислотных остатков: Иле, 2,6; Лей, 2,3; Фен, 2,0; Вал, 1,8; Цис, 1,7; Мет, 1,3; Ала, 0,8; Три, 0,8; Тир, 0,2; Тре, -0,3; Гис, -0,8; Сер, -1,0; Гли, -1,1; Глн, -1,3; Про, -1,4; Глу, -1,5; Асн, -2,1; Асп, -2,1; Лиз, -2,1; Арг, -2,2 — полученная нами на основе данных, представленных в работах [4—6].

**Построение профиля гидрофобного момента структурированных участков белков по их аминокислотной последовательности.** Гидрофобный момент ( $\mu$ ) является мерой амфифильности белкового сегмента из  $N$  аминокислотных остатков [7]. Если трехмерная структура белка известна, то гидрофобный момент может быть рассчитан из соотношения:

$$\mu_s = \sum_{n=1}^N H_n S_n, \quad (1)$$

где  $H_n$  — значение гидрофобности  $n$ -го остатка и  $S_n$  — соответствующий вектор в направлении от ядра  $C_\alpha$  — углеродного атома к геометрическому центру боковой цепи.

Для сегмента белка с известной первичной структурой гидрофобный момент может быть рассчитан при условии его периодичности и известном периоде. Если периодический сегмент белка рассматривать вдоль его оси, то для структуры с периодом  $m$  угол поворота  $\sigma$  между двумя соседними боковыми радикалами, выступающими из основной цепи, вычисляется по формуле:  $\sigma = 2\pi/m$ . Поэтому для  $\alpha$ -спирали  $\sigma = 100^\circ$  ( $m = 3,6$ ), а для нити  $\beta$ -структуры  $\sigma = 160^\circ$  ( $m = 2, 3$ ) или  $\sigma = 180^\circ$  ( $m = 2$ ). В любом случае значение гидрофобного момента периодической структуры белка  $\mu$  можно рассчитать по следующему уравнению:

$$\mu = \left\{ \left[ \sum_{n=1}^N H_n \sin(\sigma_n) \right]^2 + \left[ \sum_{n=1}^N H_n \cos(\sigma_n) \right]^2 \right\}^{1/2}, \quad (2)$$

из которого следует, что гидрофобный момент представляет собой некую векторную сумму гидрофобности остатков в сегменте из  $N$  элементов. Гидрофобность каждого остатка  $Hn$  представлена в виде вектора, который характеризуется углом  $n\sigma$ .

Форма уравнения (2) предполагает, что в более общем виде угол  $\sigma$  является переменной величиной, которая может иметь любое значение от  $0^\circ$  (для  $\alpha$ -спирали с бесконечным повтором) до  $180^\circ$  (для прямой нити  $\beta$ -структуры). В таком случае гидрофобный момент является модулем фурье-преобразования одномерной функции, зависящей от гидрофобности аминокислотных остатков вдоль белкового сегмента:

$$\begin{aligned} \mu(\sigma) &= \left\{ \left[ \sum_{n=1}^N Hn \sin(\sigma_n) \right]^2 + \left[ \sum_{n=1}^N Hn \cos(\sigma_n) \right]^2 \right\}^{1/2} = \\ &= \left| \sum_{n=1}^N Hn e^{i\sigma n} \right| \end{aligned} \quad (3)$$

Таким образом,  $\mu(\sigma)$  является количественной мерой компоненты периодичности, имеющей частоту  $\sigma$ . Эта величина может быть рассчитана для любой аминокислотной последовательности путем подстановки соответствующих гидрофобностей в уравнение (3). Большие значения  $\mu$  для определенного угла  $\sigma$  указывают на сильную компоненту периодичности при этом угле  $\sigma$ .

Расчет  $\mu(\sigma)$  для структурированных участков аденилатциклазы мозга проводился нами с использованием значений стандартизованных гидрофобностей аминокислотных остатков: Арг, -2,53; Лиз, -1,50; Асп, -0,90; Глн, -0,85; Асн, -0,78; Глу, -0,74; Гис, -0,40; Сер, -0,18; Тре, -0,05; Про, 0,12; Тир, 0,26; Цис, 0,29; Гли, 0,48; Ала, 0,62; Мет, 0,64; Три, 0,82; Лей, 1,06; Вал, 1,08; Фен, 1,19; Иле, 1,38 [4].

При построении профилей гидрофобного момента рассматривались  $\alpha$ -спирали, содержащие не менее семи аминокислотных остатков, а  $\beta$ -структурные участки — не менее четырех аминокислотных остатков, как это принято в работе [7].

**Результаты и их обсуждение.** Используя предсказательные алгоритмы, мы получили вероятную модель вторичной структуры аденилатциклазы мозга, согласно которой ее молекула содержит 46,1%  $\alpha$ -спиралей, 17,9%  $\beta$ -структуры и 14,3%  $\beta$ -поворотов (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Теоретическая локализация элементов вторичной структуры в молекуле аденилатциклазы мозга \*

$\alpha$ - спираль			$\beta$ - структура		$\beta$ - поворот	
23 - 27	35 - 43	46 - 52	124 - 139	184 - 188	6 - 16,	27 - 32
55 - 74	76 - 83	99 - 118	200 - 204	226 - 236	86 - 89	94 - 98
166 - 179	191 - 199	219 - 225	291 - 300	356 - 360	145 - 149	161 - 164
237 - 253	255 - 259	263 - 273	398 - 403	405 - 411	259 - 263	273 - 276
276 - 287	303 - 312	321 - 333	439 - 443	453 - 457	287 - 290	333 - 336
336 - 355	366 - 382	387 - 395	468 - 471	528 - 532	434 - 439	457 - 460
412 - 422	426 - 434	444 - 450	551 - 555	566 - 572	464 - 467	479 - 482
473 - 478	490 - 495	508 - 515	668 - 689	692 - 697	487 - 490	515 - 518
518 - 524	537 - 549	556 - 560	737 - 752	755 - 775	533 - 537	562 - 566
573 - 602	605 - 624	627 - 633	862 - 874	892 - 895	665 - 668	702 - 708
637 - 647	649 - 657	709 - 713	998 - 1000	1052 - 1057	713 - 717	855 - 859
717 - 721	728 - 734	790 - 835	1068 - 1071	1085 - 1090	939 - 942	1013 - 1016
846 - 855	882 - 888	896 - 925	1103 - 1105	1110 - 1112	1033 - 1036	1040 - 1043
929 - 933	942 - 969	1007 - 1012			1047 - 1051	1091 - 1095
1020 - 1033	1037 - 1040				1096 - 1099	1100 - 1103
					1106 - 1109	1112 - 1116
					1118 - 1123	1125 - 1128

\* Приведены порядковые номера аминокислотных остатков в полипептидной цепи.

Анализ профиля гидрофобности (рис. 1) позволяет выделить в молекуле аденилатциклазы мозга *N*-концевую область (остатки 1—61), два обширных цитоплазматических домена (237—611 и 807—1134) и два высоко гидрофобных домена (62—236 и 612—806), каждый из которых содержит по шесть трансмембранных сегментов (локализация последних представлена в табл. 2). Эти данные находятся в полном соответствии с общим строением аденилатциклазы высших эукариот [1].

Данные, приведенные в табл. 2, свидетельствуют о том, что в областях трансмембранных сегментов аденилатциклазы мозга предсказываются как  $\alpha$ -спиральная, так и  $\beta$ -структурная конформации.

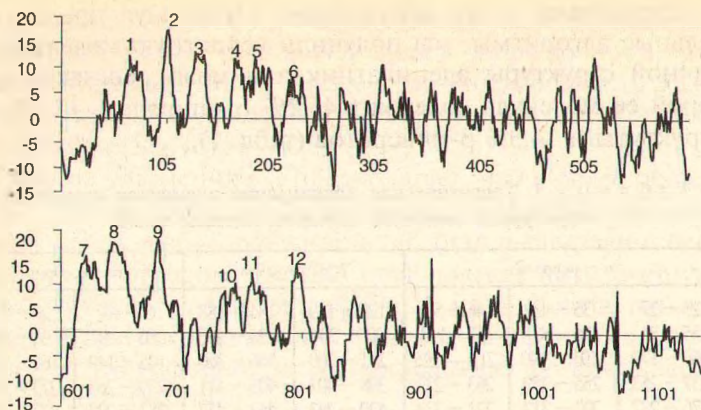


Рис. 1. Профиль гидрофобности аденилатциклазы мозга; по оси абсцисс — номера аминокислотных остатков, по оси ординат — суммарное значение гидрофобности нонапептидов

Т а б л и ц а 2. Вторичная структура трансмембранных сегментов аденилатциклазы мозга

№ п/п	Трансмембранные сегменты	$\alpha$ -Спиральные участки	$\beta$ -Структурные участки
I	Ала 62 — Лей 83	Ала 62 — Ала 74; Ала 76 — Лей 83	—
II	Вал 99 — Арг 114	Вал 99 — Арг 114	—
III	Вал 124 — Лей 144	—	Вал 124 — Цис 139
IV	Вал 165 — Вал 181	Три 166 — Лей 179	—
V	Лей 184 — Лей 204	Лей 191 — Лей 199	Лей 184 — Гли 188; Вал 200 — Лей 204
VI	Лей 216 — Лей 236	Асн 219 — Гли 225	Вал 226 — Лей 236
VII	Тре 612 — Иле 633	Тре 612 — Лей 624; Лей 627 — Иле 633	—
VIII	Вал 637 — Лей 657	Вал 637 — Иле 647; Фен 649 — Лей 657	—
IX	Вал 676 — Про 698	—	Вал 676 — Ала 689; Цис 692 — Лей 697
X	Сер 728 — Сер 750	Сер 728 — Лей 734	Лей 737 — Сер 750
XI	Мет 755 — Сер 772	—	Мет 755 — Сер 772
XII	Про 790 — Арг 806	Про 790 — Арг 806	—

Трансмембранные сегменты I, II, IV, VII, VIII и XII по данным предсказания находятся полностью в  $\alpha$ -спиральной



конформации, а сегменты III, IX и XI — в  $\beta$ -структурной конформации. Трансмембранные сегменты V, VI и X содержат участки в  $\alpha$ -спиральной и  $\beta$ -структурной конформациях.

Сопоставление аминокислотных последовательностей и вторичной структуры цитоплазматических доменов аденилатциклазы (рис. 2) выявило их значительную гомологию (27,9%) и достаточно высокую идентичность конформационного состояния аминокислотных остатков (44%). Однако различный характер расположения  $\beta$ -поворотов, во многом определяющих общую архитектуру белков, свидетельствует в пользу того, что цитоплазматические домены аденилатциклазы имеют различное пространственное строение и, вследствие этого, вероятно, выполняют в белке разные функции.

На рис. 3 представлена графическая зависимость  $\mu$  от  $\sigma$ , т. е. профили гидрофобного момента для предсказанных трансмембранных и внеклеточных  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -участков аденилатциклазы мозга. Видно, что усредненные профили гидрофобного момента для 25 внеклеточных  $\alpha$ -спиралей (кривая 3) и 17 нитей  $\beta$ -структуры (кривая 4) аденилатциклазы мозга расположены на графике гораздо выше, чем соответствующие усредненные профили для 12 трансмембранных  $\alpha$ -спиралей (кривая 1) и 8 нитей  $\beta$ -структуры (кривая 2). Эти данные находятся в полном соответствии с представлениями о том, что  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -нити, находящиеся на поверхности белков, являются более амфифильными, следовательно, имеют более высокие значения гидрофобного момента, чем внутренние сегменты белка [7], а тем более трансмембранные участки.

Профиль гидрофобного момента внеклеточных  $\alpha$ -спиралей (кривая 3) аденилатциклазы имеет доминирующий максимум при  $100^\circ$ , который является характерным для  $\alpha$ -спиральных сегментов водорастворимых белков [7]. Интересно отметить, что усредненный профиль гидрофобного момента трансмембранных  $\alpha$ -спиралей, наряду со слабым пиком при  $100$ — $110^\circ$ , характеризуется доминирующим пиком при  $130^\circ$  (кривая 1). Несмотря на то, что положение пиков на профиле гидрофобного момента в значительной степени определяется типом вторичной



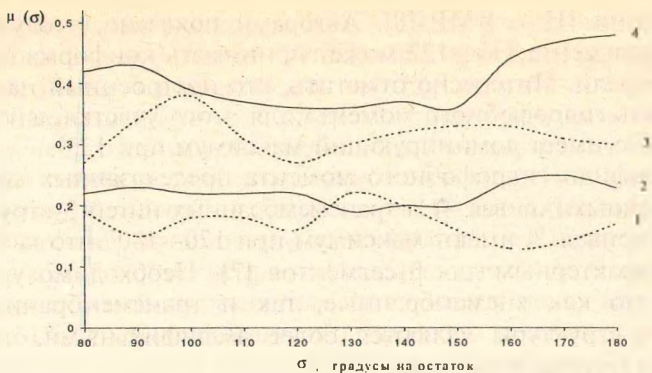


Рис. 3. Профили гидрофобного момента для трансмембранных и внеклеточных  $\alpha$ -спиральных и  $\beta$ -структурных участков аденилатциклазы мозга 1 — трансмембранные  $\alpha$ -спирали; 2 — трансмембранные нити  $\beta$ -структуры; 3 — внеклеточные  $\alpha$ -спирали; 4 — внеклеточные нити  $\beta$ -структуры

структуры того или иного пептида, не все участки, которые являются  $\alpha$ -спиральными, дают на профиле максимум при  $100^\circ$  [7]. Одним из важнейших факторов, вызывающих смещение доминирующего пика на профиле гидрофобного момента  $\alpha$ -спиралей, является характер распределения гидрофобных остатков вдоль цепи анализируемого сегмента [7]. Установление особенностей характера распределения гидрофобных остатков в предсказанных трансмембранных и внеклеточных  $\alpha$ -спиралях аденилатциклазы мозга является предметом наших дальнейших исследований.

Поскольку для идеальной  $3_{10}$ -спирали  $\sigma = 120^\circ$  ( $m = 3,0$ ), то с определенной степенью осторожности можно также предположить, что причиной доминирующего максимума при  $130^\circ$  на профиле гидрофобного момента предсказанных трансмембранных  $\alpha$ -спиралей является возможность некоторых участков этих трансмембранных сегментов принимать различные спиральные конформации: правая  $\alpha$ -спираль,  $3_{10}$ -спираль и их комбинации. На эту возможность указывают данные исследования пространственной структуры синтетического аналога фрагмента 87—136 бактериоопсина, проведенного методом двумерной спек-

троскопии  $^1\text{H}$  — ЯМР [8]. Авторами показано, что участок фрагмента 113—122 может принимать конформацию  $3_{10}$ -спирали. Интересно отметить, что построенный нами профиль гидрофобного момента для этого участка действительно имеет доминирующий максимум при  $130^\circ$ .

Профили гидрофобного момента предсказанных вне-мембранных (кривая 4) и трансмембранных нитей  $\beta$ -структуры (кривая 2) имеют максимум при  $170$ — $180^\circ$ , что является характерным для  $\beta$ -сегментов [7]. Необходимо указать, что как внемембранные, так и трансмембранные нити  $\beta$ -структуры являются более амфифильными, чем соответствующие  $\alpha$ -спирали.

### Литература

1. Tang W.-J., Gilman A.G. // Cell. 1992. Vol. 70. P. 869—872.
2. Krupinski J., Coussen F., Bakalyar H. et al. // Science. 1989. Vol. 244. P. 1558—1564.
3. Barkowsky E. V. // Acta Biol. Med. Germ. 1982. Vol. 41. № 9. P. 751—758.
4. Eisenberg D., Schwarz E., Komaromy M. et al. // J. Mol. Biol. 1984. Vol. 179. № 1. P. 125—142.
5. Hopp T. P. // Ann. Sclavo. 1984. № 2. P. 47—60.
6. Kyte J., Doolittle R. F. // J. Mol. Biol. 1982. Vol. 157. P. 105—132.
7. Eisenberg D., Weiss R. M., Terwilliger T. C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. Vol. 81. P. 140—144.
8. Масленников И. В., Луговской А. А., Арсеньев А. С. и др. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23. № 10. С. 771—782.

УДК 616.441-008.63-092:616.82]-07

*С. Н. Белугин\**, *А. И. Кубарко\**,  
*Н. Такамура\*\**, *С. Ямашита\*\**

## ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГАМК-РЕЦЕПТОР-ЗАВИСИМОГО ТОРМОЖЕНИЯ В ГИППОКАМПЕ ПРИ ГИПОТИРЕОИДИЗМЕ У КРЫС

Роль тиреоидных гормонов в онтогенетическом становлении функций мозга общеизвестна. Недостаточная

---

\* Минский государственный медицинский институт, Беларусь.

\*\* Медицинская школа университета Нагасаки, Япония.