

Cite this article: Barannik T.V., Lebedieva M.E. Search for putative heme binding sites in the integrated membrane protein of human erythrocytes SLC4A1 and protein kinases SYK and LYN. The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University, Series "Biology", 2021, 36, 4–15.

... БІОХІМІЯ ... BIOCHEMISTRY ...

УДК: [577.112+576.314+577.127.3]:57.052

Пошук потенційних сайтів зв'язування гему в інтегральному білку мембрани еритроцитів людини SLC4A1 та протеїнкіназах SYK і LYN

Т.В. Бараннік, М.Є. Лебедєва

Білок SLC4A1, або білок смуги 3 (band 3) є одним з найбільш поширених мембранних білків еритроцитів. Поряд із функцією аніонного обмінника він бере участь у контролі форми і тривалості життя клітин через утворення різноманітних комплексів із компонентами цитоскелету та ферментами. За умов оксидативного стресу відбуваються окислювальні модифікації білка, в тому числі внаслідок зв'язування агрегатів гемоглобіну, але прямий ефект гему, як основного продукту розпаду гемоглобіну, на активність білку смуги 3 не описаний в літературі. Відомо, що гемолітичні стани супроводжуються фосфорилуванням білку SLC4A1 нерецепторними тирозинпротеїнкіназами LYN (по залишку Y359) і SYK (по залишках Y8 і Y21), а інгібітори кінази SYK мають стабілізуючий вплив на еритроцити. Показаний регуляторний вплив гему на Src-кінази, до яких належать кінази SYK і LIN, але сайти їх взаємодії з гемом не встановлені. У зв'язку з вищесказаним, метою цієї роботи став пошук потенційних сайтів зв'язування гему в інтегральному білку мембрани еритроцитів SLC4A1, а також у протеїнкіназах SYK і LYN та їх комплексах з SLC4A1, змодельованих *in silico*. Аналіз послідовностей білків інструментом HeMoQuest виявив декілька нонапептидів із потенційними гем-зв'язувальними сайтами в білку SLC4A1, в тому числі цитозольний His98 і залишки Tyr553 та Tyr555 в ділянці між трансмембранними сегментами TM5 і TM6. Ці залишки разом з амінокислотами Tyr216, His303 та His192 були також передбачені як сайти зв'язування гему програмою HemeBIND. Найбільша кількість потенційних сайтів зв'язування гему виявлена для протеїнкінази SYK, серед них два цитозольні залишки Tyr216 і His303. Молекулярний докінг білку SLC4A1 виявив сайт зв'язування гему у порожнині між His192 і ділянкою 173–176 у структурі цитозольного домену (PDBID4KY9 і 1HYN), в тому числі у складі змодельованого комплексу з кіназами SYK або LYN. Слід зазначити, що ділянка 175–185 відома як сайт зв'язування анкірину. Докінг гему до мембранного домену (PDBID4YZF) виявив потенційний сайт зв'язування гему біля Lys539 у TM5, що, за даними літератури, належить до одного з реактивних центрів, чутливих до інгібітору аніонного транспорту DIDS. Молекулярний докінг до протеїнкінази SYK з АТФ в активному сайті (PDBID 4FL2) виявив два вірогідних сайти зв'язування гему – біля Tyr64 і біля His243, але при використанні pdb-файлу з видаленим АТФ гем займав саме ділянку зв'язування нуклеотиду у порожнині біля Lys402 і His531. Протеїнкіназа LYN (PDBID 5XY1) мала сайт зв'язування гему біля Tyr321, якщо структура містила молекулу інгібітору (похідне піперазину). За умов видалення інгібітору гем займав його ділянку біля Glu290 і Ala371. У більшості моделей комплексів білок смуги 3 був більш вірогідним сайтом зв'язування гему, ніж протеїнкінази LYN і SYK, але вільні кінази із відкритими активними сайтами можуть зв'язувати гем замість субстрату, що буде заважати фосфорилуванню. Порушення функціонування білку смуги 3 за умов накопичення гему може інгібувати транспорт аніонів або ускладнювати утворення комплексів білку SLC4A1 з білками цитоскелету, що, поряд із впливом на фосфорилування, може бути одним з механізмів зниження стабільності еритроцитів.

Ключові слова: SLC4A1, білок смуги 3, фосфорилування, SYK, LYN, зв'язування гему, еритроцити, гемоліз, молекулярний докінг, HeMoQuest, HemeBind.

Про авторів:

Т.В. Бараннік – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, tbarannik@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-8123-3871>

М.Є. Лебедєва – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, lebedievarharyta@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7314-0165>

Вступ

Білок SLC4A1, або білок смуги 3 (band 3) функціонує як аніонний обмінник і сайт взаємодії із елементами цитоскелету. В еритроцитах займає близько 25 % поверхні, що робить його основним

мембранним глікопротеїном. Через взаємодію із іншими білками SLC4A1 також виконує певні регуляторні функції, в тому числі впливає на енергетику клітин, бере участь у контролі форми і тривалості життя еритроцитів (Chu, Low, 2006; Reithmeier et al., 2016). Білок SLC4A1 людини містить 911 амінокислотних залишків, організованих у два домени. Мембранний домен організований у 14 трансмембранних сегментів (TM), які формують коровий (core) і воротний (gate) домени (Reithmeier et al., 2016). До воротного домену входять 5–7 та 12–14 TM сегменти, що з'єднані з коровим доменом (TM4–TM5, TM7–TM8, TM11–TM12). Glu681 у TM8 є центром аніон-протонного котранспорту. Взаємне положення корового та воротного доменів значно змінюється в ході аніонного транспорту (Reithmeier et al., 2016). N-кінцевий цитозольний гідрофільний домен (1–360) є ключовим сайтом прикріплення компонентів цитоскелету, насамперед анкірину в ділянках 63–73 та 175–185 (Grey et al., 2012), а також може взаємодіяти з гліколітичними ферментами через перші 23 залишки SLC4A1 (Chu, Low, 2006). Слід зазначити, що SLC4A1 у складі анкіринового та актинового комплексів забезпечує взаємодію мембрани і цитоскелету, необхідну для підтримання форми і функціональної активності еритроцитів (Kodippili et al., 2012; Welbourn et al., 2017). В умовах гіпоксії цитозольний домен може зв'язати дезоксигемоглобін, який після приєднання до мембрани набуває більшої спорідненості до кисню (Walder et al., 1984; Weber et al., 2004).

За умов окислювального стресу білок SLC4A1 стає мішенню нерецепторних тирозинових протеїнкіназ. Так, була показана ковалентна модифікація цитозольного домену білку смуги 3 по трьох залишках тирозину, відповідно Tyr359 – протеїнкіназою LYN, аTyr8 і Tyr21 – протеїнкіназою SYK (Brunati et al., 2000). Тирозинпротеїнкіназа LYN належить до родини Src, проявляє властивості протоонкогену і задіяна у регуляції диференціювання еритроцитів (Slavova-Azmanova et al., 2014). Протеїнкіназа SYK бере участь у сигналіngu в ході еритропоєзу і координує дію ростових факторів (Chang et al., 2017). Фосфорилування SLC4A1 відбувається за умов окислювальних модифікацій білка, зв'язування агрегатів гемоглобіну і серед наслідків має посилення гемолізу. Показано, що гемолітичні захворювання та малярія супроводжуються гіперфосфорилуванням SLC4A1 (Roumenina et al., 2016), а інгібітори кінази SYK мають стабілізуючий вплив на еритроцити (Pantaleo et al., 2016; Brunati et al., 2000). Значний вплив фосфорилування на функціональний стан еритроцитів робить кінази, що модулюють активність білку SLC4A1, перспективними мішенями для терапії гемолітичних станів і обумовлює актуальність аналізу впливу гему на їх активність. Гем є основним продуктом розпаду гемоглобіну і за умов внутрішньосудинного гемолізу значно накопичується в плазмі крові та інших тканинах, де може мати пошкоджуючу дію як прооксидант з амфіпатичними властивостями (Belcher et al., 2010). Встановлено також регуляторну дію гему на низку білків, задіяних у відповіді на оксидативний стрес, але прямі ефекти гему на активність білку смуги 3 та його регуляторів в літературі не описані. У зв'язку з вищесказаним, **метою цієї роботи** став пошук потенційних сайтів зв'язування гему у цитоплазматичному і мембранному доменах інтегрального білку мембрани еритроцитів SLC4A1, а також у протеїнкіназах SYK і LYN та їх комплексах з SLC4A1, змодельованих *in silico*.

Об'єкти та методи дослідження

В роботі аналізували білки людини SLC4A1 (Gene ID 6521; UniProt ID P02730), SYK (Gene ID: 6850; UniProt ID P43405) і LYN (Gene ID: 4067; UniProt ID P07948). Об'єктами дослідження були канонічні амінокислотні послідовності (завантажені з UniProt) і моделі просторової структури, відібрані з відомих на цей час експериментально досліджених структур (за даними PDB). Характеристики структур, взятих для аналізу, наведені у табл. 1. Для аналізу мембранного домену білка смуги 3 була обрана модель 4YZF, що містить два димери з майже повною послідовністю (ланцюги A/B, C/D). У файлі 4yzf.pdb зі структури олігомеру були відокремлені ланцюги A і B для подальшого докінгу з гемом та цитозольними доменами. Для аналізу цитозольного домену використовували моделі 1HYN (379 залишків) та 4KY9 (306 залишків), які не містили лігандів. Для аналізу кінази SYK була обрана PDB модель 4FL2 (635 залишків), що містить в якості лігандів похідне АМФ та іон магнію. Для кінази LYN використана модель 5XY1, що охоплює кіназний домен і має інгібітор на основі хіназоліну в якості ліганду у сайті зв'язування АТФ. Всі обрані моделі не містили мутацій. Структурні файли у форматі *.pdb були завантажені з Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

Таблиця 1. Дані про структуру білків людини, які були використані для аналізу (за даними PDB і UniProt, в ангстремах Å вказана роздільна здатність pdb-структур)**Table 1. Data on the structure of human proteins that were used for analysis** (according to PDB and UniProt, the angstroms Å indicate the resolution of the pdb-structures)

Назва білку	Символ гену	PDB ID	Å	Ділянка	Кількість ланцюгів, особливості складу
Band 3 anion transport protein	SLC4A1	1HYN	2,6	56–349 (цитозольний домен)	4 (2 димери: ланцюги P+Q; R+S)
		4KY9	2,23	51–356 (цитозольний домен)	2 (димер: ланцюги A і P)
		4YZF	3,50	381–887 (мембранний домен)	4 ланцюги належать SLC4A1 (2 димери: A+B; C+D)
Tyrosine protein kinase SYK	SYK	4FL2	2,19	1–635	1 (ланцюг A), ліганди: АТФ, Mg ²⁺
Tyrosine protein kinase LYN	LYN	5XY1	2,70	239–512 (кіназний домен)	1 (ланцюг A), ліганд – похідне піперазину

Візуалізація структури білків проводилася за допомогою програми UCSF CHIMERA (Pettersen et al., 2004). Аналіз контактних поверхонь субодиниць, відстаней між амінокислотними залишками та гемом проводили у програмі Swiss-PdbViewer 4.1.0 (Johansson et al., 2012).

Молекулярний докінг білків з моделюванням комплексів проводився за допомогою: ZDOCK (<http://zdock.umassmed.edu/>) (Pierce et al., 2014).

Молекулярний докінг білків з гемом проводився з використанням PatchDock (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/index.html>) (Schneidman-Duhovny et al., 2005) та сервісу SwissDock (<http://www.swissdock.ch/>) (Grosdidier et al., 2011). Файл гем у форматі *.pdb був завантажений з PubChem (<https://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/pdbechem/>). Файл гем у форматі *.mol2, був завантажений з ZINC database (<https://zinc.docking.org/>).

Для аналізу послідовностей на наявність консервативних гем-зв'язувальних ділянок використовували спеціалізовані програми HemeBind (<http://mleg.cse.sc.edu/hemeBIND/>) (Liu, Hu, 2011) і HeMoQuest (<http://131.220.139.55/SeqDHBM/>) з двома різновидами розрахунків залежно від врахування доступності розчинника. Величина константи дисоціації менше 1 μM свідчила про високу афінність, 1–5 μM – середню силу зв'язування гему і більше 5 μM – про слабкі взаємодії (Paul George et al., 2020).

Результати і обговорення

Аналіз послідовностей білків SLC4A1, SYK і LYN. Згідно із сучасними уявленнями, існують декілька варіантів гем-регуляторних мотивів (heme-regulatory motif, HRM), в яких центром зв'язування гему може бути цистеїн, розташований поруч із проліном у Cys-Pro і Pro-Cys патернах (Zhang, Guarente, 1995), або залишки гістидину чи тирозину у складі патернів із зарядженими амінокислотами (Wißbrock et al., 2019). Для вказаних варіантів розроблені відповідні алгоритми передбачення гем-зв'язувальних залишків за амінокислотою послідовністю. Слід зазначити, що білок смуги 3 (911 амінокислот, АК) має в своєму складі всього 5 залишків цистеїну, жодний з яких не знаходиться поруч із проліном і не бере участь у дисульфідних містках. Білок SYK (635 АК) містить два CP-мотиви з Cys592 і Cys596 і один PC-мотив (Cys259). Кіназа LYN (512 АК) містить один CP-мотив з Cys467 і один PC-мотив з Cys203.

Аналіз послідовності SLC4A1 з використанням алгоритму HemeBIND передбачив близько 40 амінокислотних залишків в цитозольному і 60 залишків в мембранному доменах, як потенційних сайтів зв'язування гему. Серед всіх амінокислот переважали гідрофобні (79), в той час як заряджені були представлені Lys174, Arg180, Glu196 і Arg344 (цитозольний домен) та Glu755, Lys757 і Arg760, що локалізовані в цитозольній петлі між TM10 і TM11. Окрім того, була передбачена можливість взаємодії з гемом через His98, His192, Cys201 і Tyr347 цитозольного домену та амінокислоти,

локалізовані у зовнішніх петлях мембранного домену – Tyr553 і Tyr555 (між TM5 і TM6) і His651 (між TM7 і TM8).

Для протеїнкінази SYK передбачені сайти зв'язування гему у His170 і His280, а також у восьми залишках тирозину (203, 216, 244, 296, 323, 348, 352, 389). У протеїнкінази LYN був передбачений лише один сайт взаємодії на основі тирозину (Tyr306), жодних центрів з гістидином або цистеїном розрахунки HemeBind не виявили. Слід зазначити, що в основу алгоритму HemeBIND покладено порівняння послідовності-запиту із консервативними мотивами гемопротеїнів без врахування просторової структури.

Програма HeMoQuest (Paul George et al., 2020) виявляє в білкових послідовностях специфічні нонапептиди, що мають в якості потенційних центрів зв'язування гему залишки гістидину, тирозину або цистеїну. Аналіз послідовності SLC4A1 показав наявність декілька амінокислотних мотивів як у цитозольному, так і мембранному домені між трансмембранними сегментами, у складі яких є амінокислоти із підвищеною афінністю до гему (табл. 2).

Таблиця 2. Потенційні сайти зв'язування гему (з константою дисоціації $K_d \leq 1 \mu\text{M}$) у білку смуги 3 та протеїнкіназах SYK і LYN – за результатами аналізу послідовностей в програмі HeMoQuest

Table 2. Putative heme binding sites (with a dissociation constant $K_d \leq 1 \mu\text{M}$) in the protein band 3 and protein kinases SYK and LYN – according to the results of sequence analysis in HeMoQuest program

Сайт зв'язування	Нонапептид	Заряд	K_d	Ділянка білку	
SLC4A1	His47	ATDYHTTSH	+1	0,56	Цитозольний домен
	Tyr58	THKVYVELQ	+1	0,1	
	His161	LLLKHSAG	+3	0,06	
	Tyr818	KPPKYHPDV	+2	0,26	Мембранний домен, цитозольна петля між TM12 і TM13
	His819	PPKYHPDVP	+1	0,28	
SYK	His62	GRKANHHTI	+4	0,42	SH2 домен 1
	His170	MPWFHGGKIS	+2	0,98	SH2 домен 2
	Tyr216	KVLHYRIDK	+3	0,19	Інтердомен В
	Cys259	LTVPCQKIG	+1	0,71	
	His303	PKPGHRKSS	+4	0,44	
	Tyr364	PKEVYLDRK	+1	0,79	
	Tyr459	PLNKYLQQN	+1	0,53	Протеїнкіназний домен
	His465	QQNRHVKDK	+3	0,49	
	Cys593	ERMGCAPAGC	0	0,96	
LYN	His299	KTLQHDKLV	+2	0,88	Протеїнкіназний домен
	Tyr306	LVRLYAVVT	+1	0,17	
	Cys419	INFGCFTIK	+1	0,47	
	Tyr444	GKIPYPGRT	+2	0,25	

Окрім того, були виявлені декілька нонапептидів із середньою потенційною афінністю до гему ($1 \mu\text{M} < K_d < 5 \mu\text{M}$) із центрами у His98 (WGRPHLSHL, $K_d = 3,64$) і Tyr392 (RRYPYYLSD, $K_d = 1,25$) цитозольного домену, а також сайти мембранного домену – у зовнішній петлі між TM5 і TM6 – His547 (IFQDHPLQK, $K_d = 1,86$), Tyr553 (LQKTYNYNV, $K_d = 1,34$) і Tyr555 (KTYNYNVLM, $K_d = 2,94$), у цитозольній петлі між TM6 і TM7 – Tyr596 (KNSSYFPGK, $K_d = 1,48$) і сайт у TM13 – His834 (TWRMHLFTG, +2, $K_d = 1,68$). Слід зазначити, що залишки His98, Tyr553 і Tyr555 також були передбачені як сайти зв'язування гему і за даними HemeBind.

Найбільша кількість потенційних гем-зв'язувальних мотивів була передбачена для кінази SYK. Слід зазначити, що протеїнкінази SYK і LYN належать до родини Src-кіназ, для яких експериментально встановлено регуляторний вплив гему (Yao et al., 2010), але участь цистеїнових або інших специфічних мотивів у зв'язуванні гему кіназами Src не виявлена.

Аналіз олігомерних комплексів з білком SLC4A1. Оскільки доступність амінокислотних залишків у просторовій структурі має першорядне значення для взаємодії з лігандами, був проведений аналіз структур білків, в тому числі моделювання олігомерних комплексів білку смуги 3 з кіназами. При аналізі димеру білку SLC4A1 (модель 4YZF) за допомогою програми SwissPDB Viewer виявлені залишки амінокислот на контактній поверхні двох мембранних доменів (відстані 5Å від другого ланцюга), серед яких залишки 548–551, 568–576, 595–602, 624–627 та 810–818. Більшість цих залишків входить до ділянки 559–630, яка, за даними UniProt, задіяна у транспорті аніонів. Отже функціонування білка як аніонного переносника, вочевидь, можливо лише за умов формування димеру. Слід зазначити, що за даними UniProt мембранний домен також містить короткі ділянки, які контактують з цитозолем і позаклітинним простором, що враховувалось далі для визначення взаємного розташування мембранного та цитозольного доменів.

Для аналізу ділянок взаємодії SLC4A1 та кіназ був проведений молекулярний докінг білків у програми ZDOCK. Далі були відібрані моделі, в яких протеїнкіназа була розташована своїм каталітичним сайтом найближче до ділянок фосфорилювання білку смуги 3. Так, у варіанті комплексу цитозольного домену білку смуги 3 та кінази SYK контактними ділянками з боку SLC4A1 були амінокислотні залишки з N-кінця (4KY9, ланцюг A), а з боку SYK (4FL2) контактна поверхня містила залишки в районі активного центра ферменту – Asp494 (протонний акцептор). Ділянки контакту, передбачені для комплексу білка смуги 3 і кінази LYN, з боку ланцюга A (білок смуги 3) містили залишки на C-кінці (345–350), а з боку LYN – поруч з активним центром фермента Asp238 (протонний акцептор).

Молекулярний докінг з гемом SLC4A1, SYK і LYN. Молекулярний докінг проводився за допомогою двох сервісів, PatchDock і SwissDock, які використовують різні алгоритми. При аналізі результатів віддавали перевагу моделям, в яких гем був приєднаний до амінокислотних залишків з найбільшою спорідненістю до гему і які можуть входити до гем-регуляторних мотивів.

Розрахунки у PatchDock виявили в цитозольному домені SLC4A1 ділянки потенційного зв'язування гему в обох ланцюгах біля гістидину 192, який локалізований близько до поверхні білка. При використанні структури 4KY9 His192 виявився на найкоротшій відстані (3,37 Å) від атому заліза гему (табл. 3).

У моделі 1HYN залишками поруч із гемом виявилися Pro190, Gln191, His192, Ser193, Ser194, Ile276, Asp277, Tyr278, Thr279, Gln280 та Arg345. Найближчим до Fe²⁺ (на відстані 2,14 Å) у моделі 1HYN аналогічно виявився His192. Зазначимо, що гістидин 192 також був передбачений для зв'язування гему програмою HemeBind, але цей залишок не входить до жодного потенційного гем-зв'язувального мотиву з 9-ти амінокислот (нонапептиду) за даними HeMoQuest (табл. 2). У моделі 4YZF гем потрапив у центральну частину ланцюга A мембранного домену білка смуги 3, де поруч з ним виявилися залишки заряджених (Lys251, Lys324, Glu377) і гідрофобних амінокислот (Leu253, Met322, Ala323), але лише тирозин (Tyr321) міг би забезпечити достатньо стабільний зв'язок з гемом. Спорідненість гістидину, тирозину, цистеїну до молекули гему було встановлено на основі досліджень багатьох природних гем-зв'язувальних білків та гемопротеїнів (Wißbrock et al., 2019).

Отже, молекулярний докінг білку SLC4A1 з гемом виявив сайт зв'язування у порожнині між His192 (також передбачений HemeBind) і ділянкою 173–176 у структурі цитозольного домену (4KY9 і 1HYN), в тому числі у складі змодельованого комплексу з кіназами SYK або LYN. Слід зазначити, що ділянка 175–185 відома як сайт зв'язування анкірину. Докінг гему до мембранного домену (4YZF) виявив потенційний сайт зв'язування біля Lys539 у TM5, що, за даними літератури, належить до одного з реактивних центрів, чутливих до інгібітору аніонного транспорту DIDS.

При проведенні докінгу білка SYK з гемом за допомогою програми PatchDock при аналізі 20 найбільш вірогідних моделей зв'язування було виявлено 3 варіанти приєднання гему до 4FL2 (табл. 3). Слід відзначити два потенційні сайти зв'язування в ділянках 62–64 та 243–246, які містять амінокислоти з високою афінністю до гему (His62, His63, Tyr64, His243 і Tyr246) і просторово розташовані біля інтердомену A на певній відстані від активного центру ферменту. За даними

UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprot/P43405#function>) інтердомени кінази SYK функціонують як аутоінгібітори через зв'язування із ділянками каталітичного домену для підтримання його неактивної конформації. Активація відбувається за умов фосфорилування, в тому числі іншими кіназами родини Src, такими як LYN. При проведенні докінгу з використанням файлу, де була видалена молекула АТФ, гем займав саме ділянку зв'язування нуклеотиду у порожнині біля Lys402 і His531, причому показники енергії зв'язування збільшувались (табл. 3, рис. 1).

Таблиця 3. Характеристики потенційних сайтів зв'язування гему білку смуги 3 та протеїнкіназ SYK і LYN за даними PatchDock (розрахунок для 10 моделей з найвищими балами)
Table 3. Characteristics of putative heme binding sites in band 3 protein and protein kinases SYK and LYN according to PatchDock (calculations for 10 models with the highest scores)

Білок	PDB ID	Показник енергії зв'язування	Показник площі контакту	Потенційні сайти зв'язування гему
SLC4A1 (цитозольний домен)	4KY9 (димер)	6770–6260	928–807	Glu63, Leu64, Val65, Val173, Lys174, Pro175, His192, Ser193, Ser194
	1HYN (тетрамер)	6788–6156	828–766	Pro190, Gln191, His192, Ser193, Ser194, Ile276, Asp277, Tyr278, Thr279, Gln280, Arg345
SLC4A1 (мембранний домен)	4YZF	6316–5968	870–726	Ділянка в ТМ1 (Thr422, Phe423, Leu426), Ser465 і ділянка в ТМ3 (Gly466, Pro467, Leu469), ділянка в ТМ5 (Ile531, Glu535, Lys539)
SYK	4FL2 (з АТФ)	6126–5892	863–765	His62, His63, Tyr64, Thr65, Ile76, Gly98, Leu99, Val100, His243, Cys597, Arg625
	4FL2 (без АТФ)	6542–5996	821–772	Leu377, Ser379, Asn381, Val385, Lys402 (сайт зв'язування АТФ), Pro455, Asn457, Lys458, Leu501, His531
LYN (протеїнкіназний домен)	5XY1 (з інгібітором)	5604–5366	746–683	Lys251, Leu253, Tyr321, Met322, Ala323, Lys324, Gly325, Glu377
	5XY1 (без інгібітора)	6306–5622	778–763	Leu253, Gly254, Val261, Lys275 (сайт зв'язування АТФ), Asp372, Val373, Leu374, Gly325, Ser326, Asp329, Ala384, Asp385

При проведенні докінгу з гемом білка LYN з використанням вихідної структури 5XY1, що містила молекулу інгібітору (похідне піперазину), у 20 найбільш вірогідних моделях було виявлено 2 варіанти приєднання гему. Із усіх можливих варіантів зв'язування поруч з гемом виявилися залишки: Lys251, Leu253, Tyr321, Met322, Ala323, Lys324, Gly325, Glu377. Аналогічно докінгу з іншою протеїнкіназою, за умов видалення інгібітору з файлу pdb гем займав його ділянку (для LYN – біля Glu290 і Ala371), що значно збільшувало енергію зв'язування та площу контакту (табл. 3, рис. 2).

Порівняння результатів докінгу дозволяє зробити висновок, що за рівнем енергії зв'язування та площею контактних поверхонь, в умовах накопичення гему краще і скоріше зв'язувати гем буде білок смуги 3, але активні центри кіназ можуть конкурувати за гем, особливо за умов дефіциту АТФ. Найменша сила взаємодії передбачається для кінази LYN за умов зайнятого інгібітором активного центру.

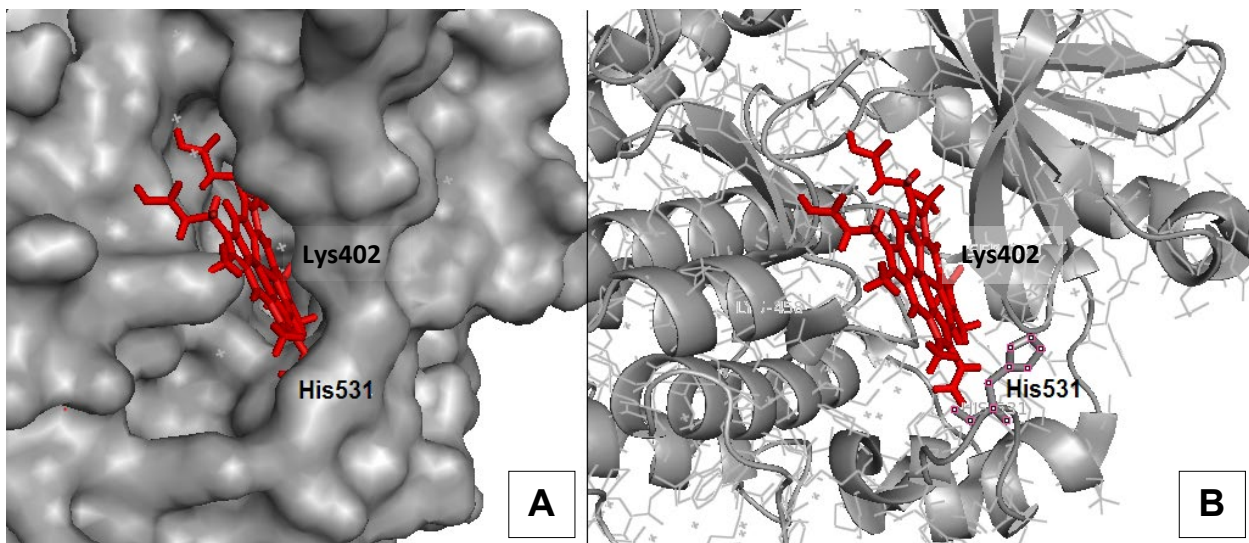


Рис. 1. Сайт зв'язування гему у моделі кінази SYK (4FL2) біля His531 і сайту зв'язування АТФ Lys402: А – показана поверхня білку SYK, В – модель з елементами вторинної структури (із збереженням проєкції)

Fig. 1. The heme binding site in SYK kinase model (4FL2), located near His531 and ATP-binding site Lys402: A – SYK protein is shown with the surface, B – with elements of the secondary structure (in the same projection)

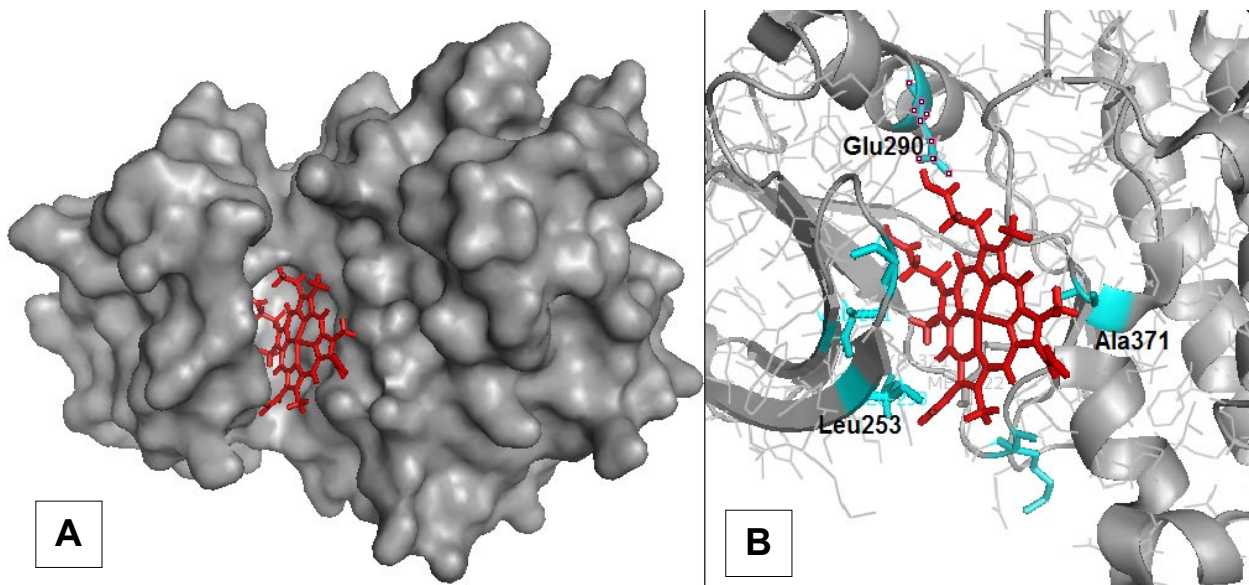


Рис. 2. Сайт зв'язування гему у моделі кінази LYN (5XY1) у ділянці зв'язування інгібітору біля Glu290, Ala371, Leu253: А – показана поверхня білку LYN, В – модель з елементами вторинної структури (зі збереженням проєкції)

Fig. 2. Heme binding site in the LYN kinase model (5XY1) in the site of inhibitor binding – near Glu290, Ala371, Leu253: A – LYN protein is shown with the surface, B – with elements of the secondary structure (in the same projection)

Для додаткового аналізу можливих сайтів зв'язування в якості другого інструменту докінгу був використаний сервер SwissDock. Цей сервіс має обмеження на завантаження білків за

кількістю атомів в молекулі рецептора, тому для SwissDock не використовували моделі 1HYN та 4YZF, які є тетрамерами та мають значні розміри. Для білка SLC4A1 (4KY9) алгоритмами SwissDock було передбачено значно більше, ніж за розрахунками PatchDock, потенційних варіантів зв'язування геміну, але серед них найбільше були представлені саме ділянки біля His192.

При проведенні докінгу SYK з геміном окрім гістидинів 62 і 63 було передбачено додаткову ділянку зв'язування біля Tyr546 і Tyr547, які, за даними SwissDock, розташовані на відстанях відповідно 6,02 Å та 4,04 Å від атому заліза гема, що достатньо для утворення стабільного зв'язку. При проведенні докінгу білка LYN з геміном за допомогою SwissDock було передбачено взаємодію білків у тій же ділянці, що розрахована PatchDock, – в оточенні Phe258, Glu320, Tyr321, Met322, хоча тирозин виявився на відстані більше 6 Å, що не може забезпечити стабільну взаємодію. Слід зазначити, що для докінгу сервери використовували різні файли лігандів – гему у форматі pdb для PatchDock і геміну у форматі mol2 для SwissDock.

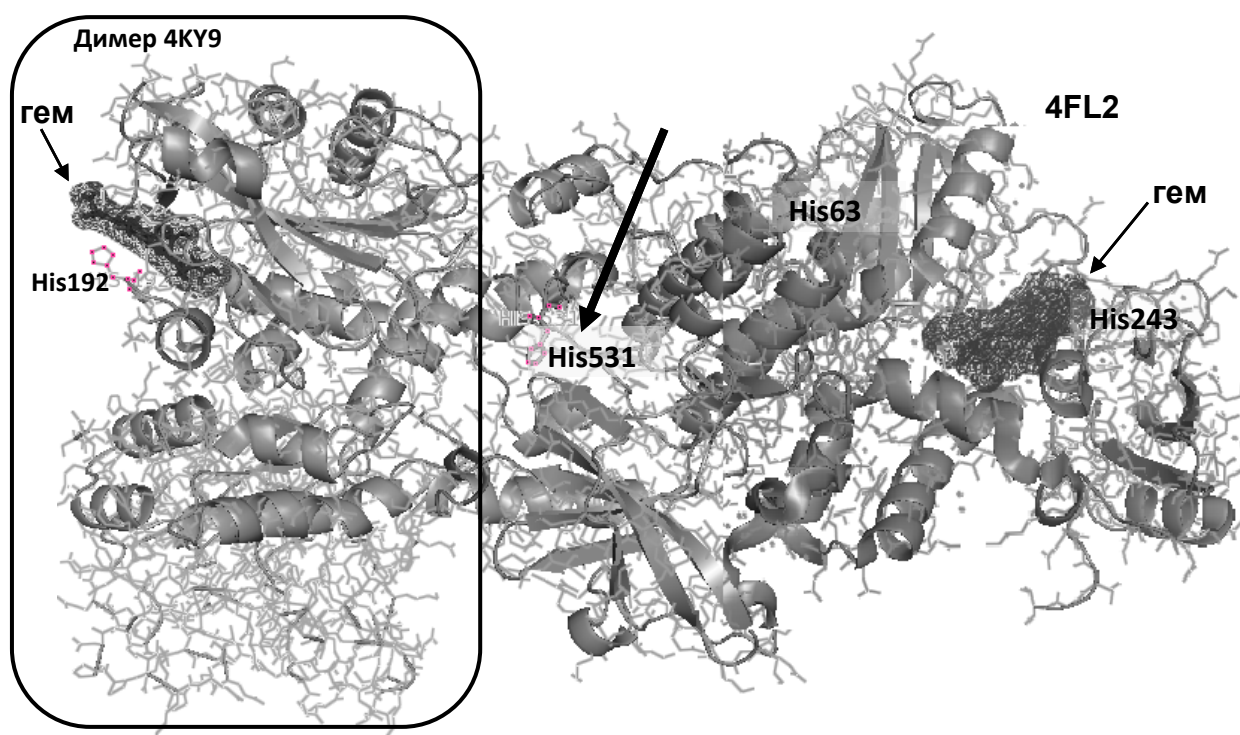


Рис. 3. Найбільш вірогідні сайти зв'язування гему у комплексі цитозольного домену SLC4A1 з протеїнкіназою SYK. Ліворуч – модель 4KY9 із вказаним His192 в субодиноці ASLC4A1, як сайт зв'язування гему. Праворуч – модель 4FL2 із вказаним His243 у сайті зв'язування гему та His531 біля активного центру ферменту SYK

Fig. 3. The most probable sites of heme binding in the complex of the cytosolic domain SLC4A1 with the protein kinase SYK. On the left – model 4KY9 with heme near His192 in A subunit of SLC4A1. On the right – the 4FL2 model with heme near His243 and His531 in proximity to the active site of the SYK enzyme

Докінг гема з комплексами білка SLC4A1 з SYK або LYN. Якщо комплекс білків вже утворився на момент початку гемолізу, сайти зв'язування гему можуть відрізнятися від ділянок для мономерних білків або окремих компонентів комплексів, окрім того може спостерігатись пряма конкуренція сайтів за зв'язування гему (рис. 3). Тому представляло інтерес моделювання взаємодії гему з комплексами білків, які були змодельовані на першому етапі дослідження. Для докінгу відбирались моделі, які мають мінімальні відстані між активним сайтом кіназ і сайтом

фосфорилування у ланцюгу білку смуги 3, також враховували взаємну орієнтацію цитозольного і мембранного домену. Були проаналізовані комплекси білку SLC4A1 на основі PDB ID 4ky9, кіназа SYK була представлена структурою 4fl2, а кіназа LYN – PDB ID 5xy1.

Лише для кінази LYN показана взаємодія гему поруч з місцем контакту з білком смуги 3. В інших моделях гем приєднується лише до одного ланцюга – або білку смуги 3, або до протеїнкінази. Сайти зв'язування частіше передбачаються на SLC4A1 поруч з His192. У більшості моделей комплексів білок смуги 3 був більш вірогідним сайтом зв'язування гему, ніж протеїнкінази LYN і SYK. Але вільні кінази із відкритими активними центрами можуть зв'язувати гем замість субстрату, що буде заважати утворенню комплексу і фосфорилуванню. Якщо узагальнити результати докінгу гему з білковими комплексами, то цитозольний домен білку смуги 3 виявився більш привабливою мішенню для гему, ніж протеїнкінази. Якщо кінази не зв'язують гем в активному центрі, то залишається можливість нормальної взаємодії з білком смуги 3 і його фосфорилування.

Згідно з результатами проведеного аналізу, сайти зв'язування гему можуть бути розташовані переважно у цитозольному та мембранному доменах білку смуги 3, що буде інгібувати його активність та порушувати мембрано-цитоскелетні взаємодії. Гем може зв'язатись безпосередньо з активним сайтом аніонного транспорту у мембранному домені. Зв'язування гему з протеїнкіназами більш вірогідно за умов дефіциту АТФ і наявності вільного активного центру або внаслідок ускладнення формування комплексів кіназ із SLC4A1.

Отже, функціонування білку смуги 3 в умовах гемолізу може бути під прямим впливом молекули гему, який з боку цитоплазми може порушувати регуляторні функції цитозольного домену, в тому числі ускладнювати утворення комплексів з білками цитоскелету. Якщо гем надходить до клітини із боку плазми крові, він може потрапляти до мембранного домену білку смуги 3 та інгібувати транспорт аніонів. Додатковим механізмом зниження стабільності еритроцитів за умов накопичення гему може явитись модуляція активності протеїнкіназ SYK і LYN, що задіяні у регуляції аніонного обмінника SLC4A1.

Висновки

1. За умов внутрішньосудинного гемолізу і надходження вільного гему з кров'яного русла транспортна функція білку смуги 3 може порушуватись під впливом прямого зв'язування гему із мембранним доменом.
2. При надходженні з боку цитоплазми за умов деградації гемоглобіну гем може взаємодіяти із цитозольним доменом і заважати утворенню комплексів SLC4A1 із цитоскелетними білками, насамперед анкірином.
3. У складі комплексу із протеїнкіназами SYK і LYN, якщо вони мають АТФ в активному центрі, білок смуги 3 є більш вірогідною мішенню для гему. Відсутність АТФ значно збільшує ймовірність зв'язування гему протеїнкіназами та інгібування їхньої каталітичної активності.

Список літератури / References

- Belcher J.D., Beckman J.D., Balla G. et al. (2010). Heme degradation and vascular injury. *Antioxid. Redox Signal*, 12(2), 233–248. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2822>
- Brunati A.M., Bordin L., Clari G. et al. (2000). Sequential phosphorylation of protein band 3 by SYK and LYN tyrosine kinases in intact human erythrocytes: identification of primary and secondary phosphorylation sites. *Blood*, 96(4), 1550–1557. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.4.1550>
- Chang H.C., Huang D.Y., Wu M.S. et al. (2017). Spleen tyrosine kinase mediates the actions of EPO and GM-CSF and coordinates with TGF- β in erythropoiesis. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.*, 1864(4), 687–696. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.01.014>
- Chu H., Low P.S. (2006). Mapping of glycolytic enzyme-binding sites on human erythrocyte band 3. *Biochem J.*, 400(1), 143–151. <https://doi.org/10.1042/BJ20060792>
- Grey J.L., Kodippili G.C., Simon K., Low P.S. (2012). Identification of contact sites between ankyrin and band 3 in the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 51(34), 6838–6846. <https://doi.org/10.1021/bi300693k>

- Grosdidier A., Zoete V., Michielin O. (2011). SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res.*, 39 (Web Server issue), W270–277. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr366>
- Johansson M.U., Zoete V., Michielin O., Guex N. (2012). Defining and searching for structural motifs using DeepView/Swiss-PdbViewer. *BMC Bioinformatics*, 13:173. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-173>
- Kodippili G.C., Spector J., Hale J. et al. (2012). Analysis of the mobilities of band 3 populations associated with ankyrin protein and junctional complexes in intact murine erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 287(6), 4129–4138. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.294439>
- Liu R., Hu J. (2011). HemeBIND: a novel method for heme binding residue prediction by combining structural and sequence information. *BMC Bioinformatics*, 12(207), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-207>
- Pantaleo A., Ferru E., Pau M.C. et al. (2016). Band 3 erythrocyte membrane protein acts as redox stress sensor leading to its phosphorylation by p(72)Syk. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2016, 6051093. <https://doi.org/10.1155/2016/6051093>
- Paul George A.A., Lacerda M., Syllwasschy B.F. et al. (2020). HeMoQuest: A webserver for qualitative prediction of transient heme binding to protein motifs. *BMC Bioinformatics*, 21, 124. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-3420-2>
- Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C. et al. (2004). UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Pierce B.G., Wiehe K., Hwang H. et al. (2014). ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers. *Bioinformatics*, 30(12), 1771–1773. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu097>
- Reithmeier R.A., Casey J.R., Kalli A.C. et al. (2016). Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. *Biochim. Biophys. Acta*, 1858(7 Pt A), 1507–1532. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.03.030>
- Roumenina L.T., Rayes J., Lacroix-Desmazes S., Dimitrov J.D. (2016). Heme: modulator of plasma systems in hemolytic diseases. *Trends Mol. Med.*, 22(3), 200–213. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.01.004>
- Schneidman-Duhovny D., Inbar Y., Nussinov R., Wolfson H.J. (2005). PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Res.*, 33 (Web Server issue), W363–367. <https://doi.org/10.1093/nar/gki481>
- Slavova-Azmanova N.S., Kucera N., Louw A. et al. (2014). LYN kinase plays important roles in erythroid expansion, maturation and erythropoietin receptor signalling by regulating inhibitory signalling pathways that control survival. *Biochem J.*, 459(3), 455–466. <https://doi.org/10.1042/BJ20130903>
- Walder J.A., Chatterjee R., Steck T.L. et al. (1984). The interaction of hemoglobin with the cytoplasmic domain of band 3 of the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.*, 259(16), 10238–10346.
- Weber R.E., Voelter W., Fago A. et al. (2004). Modulation of red cell glycolysis: interactions between vertebrate hemoglobins and cytoplasmic domains of band 3 red cell membrane proteins. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 287(2), R454–464. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00060.2004>
- Welbourn E.M., Wilson M.T., Yusof A. et al. (2017). The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane. *Free Radic. Biol. Med.*, 103, 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.024>
- Wißbrock A., Paul George A.A., Brewitz H.H. et al. (2019). The molecular basis of transient heme-protein interactions: analysis, concept and implementation. *Biosci. Rep.*, 39(1), BSR20181940. <https://doi.org/10.1042/BSR20181940>
- Yao X., Balamurugan P., Arvey A. et al. (2010). Heme controls the regulation of protein tyrosine kinases Jak2 and Src. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 403(1), 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.10.101>
- Zhang L., Guarente L. (1995). Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. *EMBO J.*, 14, 313–320. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07005.x>

Search for putative heme binding sites in the integrated membrane protein of human erythrocytes SLC4A1 and protein kinases SYK and LYN

T.V. Barannik, M.E. Lebedieva

SLC4A1 protein or band 3 protein (band 3) is one of the most common erythrocyte membrane proteins. Along with the function of the anion exchanger, it contributes to the control of cell shape and lifespan through the formation of various complexes with cytoskeletal components and enzymes. Under oxidative stress, the protein oxidative modifications occur, in particular, due to the binding of hemoglobin aggregates, but the direct effect of heme as the major product of hemoglobin degradation on the band 3 protein activity has not been described in the literature. It is known that hemolytic conditions are accompanied by phosphorylation of the SLC4A1 protein, non-receptor tyrosine protein kinases LYN (by residue Y359), and SYK (by residues Y8 and Y21), while SYK kinase inhibitors have a stabilizing effect on erythrocytes. The regulatory effect of heme on Src kinases, which include SYK and LYN kinases, has been clarified, but the sites of their interaction with heme have not been investigated. Therefore, the aim of this study was to predict putative heme binding sites in the integral protein of the erythrocyte membrane SLC4A1, as well as in the protein kinases SYK and LYN and their complexes with SLC4A1, modeled *in silico*. Sequence analysis of proteins with HeMoQuest revealed several nonapeptides with potential heme binding sites in the SLC4A1 protein, including the cytosolic His98 and Tyr553 and Tyr555 residues in the region between the TM5 and TM6 transmembrane segments. These residues, as well as the amino acids Tyr216, His303, and His192, were also predicted as heme-binding sites by HemeBind tool. The largest number of putative heme binding sites was found for SYK protein kinase, including the two cytosolic residues Tyr216 and His303. Molecular docking of the SLC4A1 protein revealed a heme binding site in the cavity between His192 and region 173–176 in the cytosolic domain structure (PDB ID 4KY9 and 1HYN), also as part of a simulated complex with SYK or LYN kinases. It should be noted that site 175–185 is known as the ankyrin binding site. Docking heme to the membrane domain (PDB ID 4YZF) revealed a putative heme binding site near Lys539 in TM5, which, according to the literature, belongs to one of the reactive centers sensitive to the anionic transport inhibitor DIDS. Molecular docking to SYK protein kinase with ATP in the active site (PDB ID 4FL2) revealed two putative heme binding sites – near Tyr64 and near His243, but when ATP was removed from pdb-file, the heme occupied a nucleotide binding site in the cavity near Lys402 and His531. LYN protein kinase (PDB ID 5XY1) had a heme binding site near Tyr321 in the structure with inhibitor molecule (piperazine derivative). After removing the inhibitor, the heme occupied its area near Glu290 and Ala371. In most model complexes, the band 3 protein was revealed to be a more likely heme binding site than LYN and SYK protein kinases, but kinases with free active sites can apparently bind a heme instead of substrate, which will interfere phosphorylation. Disruption of band 3 protein under heme accumulation can inhibit an anion transport or complicate the formation of SLC4A1 complexes with cytoskeletal proteins that together with the effects on phosphorylation could be a mechanism for reducing erythrocyte stability.

Key words: SLC4A1, band 3 protein, phosphorylation, SYK, LYN, heme binding, erythrocytes, hemolysis, molecular docking, HeMoQuest, HemeBind.

About the authors:

T.V. Barannik – V.N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, tbarannik@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-8123-3871>

M.E. Lebedieva – V.N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, lebedievarharya@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7314-0165>

Поиск потенциальных сайтов связывания гема в интегральном белке мембраны эритроцитов человека SLC4A1 и протеинкиназах SYK и LYN

Т.В. Баранник, М.Е. Лебедева

Белок SLC4A1, или белок полосы 3 (band 3) является одним из наиболее распространенных мембранных белков эритроцитов. Наряду с функцией анионного обменника он участвует в контроле формы и продолжительности жизни клеток, образуя различные комплексы с компонентами цитоскелета и ферментами. В условиях оксидативного стресса происходят окислительные модификации белка, в том числе вследствие связывания агрегатов гемоглобина. Однако прямой эффект гема как основного продукта распада гемоглобина на активность белка полосы 3 в литературе не описан. Известно, что гемолитические состояния сопровождаются фосфорилированием SLC4A1 нерецепторными тирозинпротеинкиназами LYN (по остатку Y359) и SYK (по остаткам Y8 и Y21), а ингибиторы киназы SYK оказывают стабилизирующее влияние на эритроциты. Показано регуляторное влияние гема на Src-киназы, к которым относятся киназы SYK и LYN, но

сайты их взаимодействия с гемом не установлены. В связи с вышесказанным, целью данной работы стал поиск потенциальных сайтов связывания гема в интегральном белке мембраны эритроцитов SLC4A1, а также в протеинкиназах SYK и LYN и их комплексах с SLC4A1, смоделированных *in silico*. Анализ последовательностей белков инструментом HeMoQuest выявил несколько нонапептидов с потенциальными гем-связывающими сайтами в белке SLC4A1, в том числе цитозольный His98 и остатки Tyr553 и Tyr555 в области между трансмембранными сегментами TM5 и TM6. Данные остатки наряду с аминокислотами Tyr216, His303 и His192, были также предсказаны как гем-связывающие сайты программой HemeBind. Наибольшее количество потенциальных сайтов связывания гема обнаружено у протеинкиназы SYK, среди них два цитозольных остатка Tyr216 и His303. Молекулярный докинг белка SLC4A1 выявил сайт связывания гема в полости между His192 и участком 173–176 в структуре цитозольного домена (PDB ID 4KY9 и 1HYN), в том числе в составе смоделированного комплекса с киназами SYK или LYN. Следует отметить, что участок 175–185 известен как сайт связывания с анкирином. Докинг гема к мембранному домену (PDB ID 4YZF) выявил потенциальный сайт связывания гема возле Lys539 в TM5, который, по литературным данным, относится к одному из реактивных центров, чувствительных к ингибитору анионного транспорта DIDS. Молекулярный докинг к протеинкиназе SYK с АТФ в активном сайте (PDB ID 4FL2) выявил два возможных сайта связывания гема – с Tyr64 и с His243, но при использовании pdb-файла после удаления АТФ гем занимал непосредственно участок связывания нуклеотида в полости возле Lys402 и His531. У протеинкиназы LYN (PDB ID 5XY1) показан сайт связывания гема у Tyr321 в случае, если структура содержала молекулу ингибитора (производное пиперазина). В условиях удаления ингибитора гем занимал его участок возле Glu290 и Ala371. В большинстве моделей комплексов белок полосы 3 был более вероятным сайтом связывания гема, чем протеинкиназы LYN и SYK, но свободные киназы с открытыми активными сайтами очевидно могут связывать гем вместо субстрата, что будет мешать фосфорилированию. Нарушение функционирования белка полосы 3 в условиях накопления гема может ингибировать транспорт анионов или затруднять образование комплексов белка SLC4A1 с белками цитоскелета, что наряду с влиянием на фосфорилирование может быть одним из механизмов снижения стабильности эритроцитов.

Ключевые слова: SLC4A1, белок полосы 3, фосфорилирование, SYK, LYN, гем, эритроциты, гемолиз, молекулярный докинг, HeMoQuest, HemeBind.

Об авторах:

Т.В. Баранник – Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, tbarannik@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-8123-3871>

М.Е. Лебедєва – Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, lebedievamarharyta@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7314-0165>

Подано до редакції / Received: 15.04.2021

Прорецензовано / Revised: 07.06.2021

Прийнято до друку / Accepted: 14.06.2021