

УДК: 577.112.7

### Анализ влияния мутаций в гене *LMNA* на пространственную структуру ламина А и характер его взаимодействия с эмерином и SREBP1

А.С.Забирник<sup>1,2,3</sup>, Т.В.Баранник<sup>1</sup>, Е.А.Омельченко<sup>2</sup>, Е.Э.Перский<sup>1</sup>, А.Б.Малашичева<sup>3</sup>,  
А.А.Костарева<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина (Харьков, Украина);

<sup>2</sup>Лаборатория клеточных биотехнологий «Вирола» (Харьков, Украина);

<sup>3</sup>Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А.Алмазова (Санкт-Петербург, Россия)  
arseny-z@yandex.ru

Моделирование структуры иммуноглобулин-подобного домена мутантных форм ламина выявило заметные изменения геометрии полипептидного остова данной части молекулы только при мутации *R527C*. Экспонирование заряженных аминокислот и профиль гидрофобности более выражено изменялись, соответственно, при мутациях *G465D* и *R482L*, что сопровождалось значительным изменением сродства к эмерину и SREBP1. Только для мутации *R482L* отмечено повышение сродства к обоим белкам-партнерам, в то время как для остальных мутантных белков сродство повышалось к SREBP1 и снижалось к эмерину.

**Ключевые слова:** ламинопатии, ламин А, эмерин, SREBP1, 3D-моделирование, докинг.

### Аналіз впливу мутацій в гені *LMNA* на просторову структуру ламіну А і характер його взаємодії з емерином і SREBP1

А.С.Забірник, Т.В.Бараннік, О.А.Омельченко, Є.Е.Перський, А.Б.Малашичева,  
А.А.Костарева

Модельювання структури імуноглобулін-подібного домену мутантних форм ламіну виявило помітні зміни геометрії поліпептидного остову даної частини молекули тільки при мутації *R527C*. Експонування заряджених амінокислот і профіль гідрофобності більш виражено змінювалися, відповідно, при мутаціях *G465D* і *R482L*, що супроводжувалося значними змінами спорідненості до емерину і SREBP1. Тільки для мутації *R482L* відмічено підвищення спорідненості до обох білків-партнерів, у той час як для інших мутантних білків спорідненість підвищувалася до SREBP1 і знижувалася до емерину.

**Ключові слова:** ламінопатії, ламін А, емерин, SREBP1, 3D-модельювання, докинг.

### Analysis of *LMNA* gene mutations effect on 3-dimensional structure of lamin A and mode of its interaction with emerin and SREBP1

A.S.Zabirnyk, T.V.Barannik, E.A.Omelchenko, Ye.E.Persky, A.B.Malashicheva, A.A.Kostareva

Modelling immunoglobulin-like domain structure of mutant forms of lamin revealed noticeable changes of polypeptide backbone geometry of this part of molecule only at mutation *R527C*. Exposure of charged amino acids and hydrophobicity profile were more pronouncedly changed, accordingly, under mutations *G465D* and *R482L*, that was accompanied by significant change of affinity to emerin and SREBP1. Only for mutation *R482L* the increase of affinity to both protein partners was revealed whereas for other mutant proteins the affinity increased only to SREBP1 and decreased to emerin.

**Key words:** laminopathies, lamin A, emerin, SREBP1, 3D-modelling, docking.

#### Введение

В настоящее время установлено, что наследственные заболевания тканей мезенхимального происхождения – ламинопатии – связаны с мутациями в генах белков ламин, из которых построена ядерная ламина (Dechat et al., 2010; www.umd.be/LMNA/). Показано, что, помимо выполнения структурной функции, ядерная ламина является звеном цепи передачи сигнала между цитоплазмой и хроматином, участвуя в его организации и регуляции активности генов (Mattout et al., 2007; Guelen et al., 2008; Bruston et al., 2010; Szczerbal et al., 2009). Такая передача осуществляется путём непосредственного контактного взаимодействия молекул ламин с молекулами белков-партнёров, также входящих в состав цепи передачи сигнала. Можно предположить, что мутации в молекулах

ламина могут приводить к изменению их пространственной структуры и взаимодействия с молекулами белков-партнёров. Такой эффект может быть одной из причин нарушения клеточной дифференцировки и возникновения патологий при ламинопатиях.

В связи с вышесказанным, целью данной работы было исследование влияния четырех точечных мутаций в участке гена *LMNA*, кодирующем иммуноглобулин-подобный домен ламина А, на конформацию и энергию взаимодействия ламина с белками-партнёрами – эмерином (интегральным ламинсвязывающим белком внутренней ядерной мембраны) и SREBP1 (фактором транскрипции, регулирующим синтез холестерина и метаболизм жирных кислот).

#### Объекты и методы исследования

Для исследования был выбран С-концевой иммуноглобулин-подобный домен ламина А (аминокислоты участка 438–544), в котором находятся 4 известных варианта точечных мутаций. Выбор этого участка молекулы определялся, во-первых, тем, что именно в нём находятся сайты связывания с большинством белков-партнёров ламина, в частности эмерином и SREBP1 (Sakaki et al., 2001; Lloyd et al., 2002; Clements et al., 2000). Во-вторых, тем, что С-концевой глобулярный домен ламина структурно автономен и, очевидно, испытывает незначительное влияние остальной части молекулы на конформацию и взаимодействие с белками-партнёрами.

Предсказание структуры иммуноглобулин-подобного домена мутантных ламинов А с точечными мутациями в позициях *G465D*, *R471C*, *R482L* и *R527C* было проведено методом гомологического моделирования с использованием программного пакета I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>). Шаблоном для моделирования была выбрана структура участка 436–552 ламина дикого типа, PDB ID 1IFR, который включает в себя анализируемый домен.

Структурное выравнивание проводилось с помощью сервера TM-align (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-align/>) и оценивалось по величине (RMSD) расстояния между соответствующими атомами полипептидного остова молекул сравнения и вероятности случайного сходства TM-score (Zhang, Skolnick, 2005).

Докинг ламина дикого типа (PDB ID 1IFR) и полученных моделей ламина А с эмерином EMD (PDB ID 1JEI) и SREBP1 (PDB ID 1AM9) был проведен при помощи сервиса HexProtein Docking Server (<http://hexserver.loria.fr/>) с исходными параметрами (Ritchie, Venkatraman, 2010).

Визуализация и анализ пространственных структур проводилась с помощью программ Chimera 1.9 и Swiss-PdbViewer 4.1.0. Структурные файлы в формате \*.pdb для выбранных белков были загружены с сервера Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/>).

#### Результаты и обсуждение

Предсказание пространственной структуры мутантных форм ламина выявило их общее достоверное сходство с белком дикого типа (TM-score в диапазоне 0,89–0,95). Для трех из четырех изученных мутаций RMSD выявилось менее 1 Å (табл. 1). Наименьшее сходство структур отмечено в случае замены аргинина 527 на цистеин (RMSD>1), как в случае выравнивания всего домена, так и участка из 71 аминокислоты в районе мутаций.

Таблица 1.  
Результаты структурного выравнивания ламина дикого типа (PDB ID 1IFR) с полученными моделями мутантных ламинов (представлены значения RMSD, Å)

Показатель	Вид мутации в <i>LMNA</i>			
	<i>G465D</i>	<i>R471C</i>	<i>R482L</i>	<i>R527C</i>
Весь домен	0,78	0,75	0,78	1,17
Участок 460–530	0,85	0,86	0,86	1,08

По данным моделирования пространственные изменения в мутантных молекулах не приводят к формированию новых или разрушению старых вторичных структур, однако отмечены изменения в их взаимном расположении по сравнению с ламинном дикого типа. В отличие от атомов углерода C $\alpha$ , координаты атомов боковых цепей аминокислот в окружении мутаций (по данным файлов \*.pdb) выражено отличаются от дикого типа. Вместе с тем, экспонирование аминокислотных остатков на

поверхности белка (по данным анализа Swiss-PdbViewer 4.1.0) изменяется в разной степени и может влиять на общий заряд поверхности молекулы ламина. Так, замена аргинина 471 или 482 не приводит к изменению положения данного остатка, а замена глицина 465 и аргинина 527 изменяет их доступность незначительно (табл. 2). В то же время, экспонирование заряженных аминокислот в ближайшем окружении (аспартат 475, лизины 486 и 515) изменяется более выражено, что может быть связано с их расположением в участках поворота цепи, в отличие от аминокислот в участках  $\beta$ -структуры.

Изменения пространственной структуры могут явиться следствием значительного сдвига профиля гидрофобности в точках мутаций. Так, замена глицина 465 на аспарагиновую кислоту приводит к значительному снижению гидрофобности (с 0 до -55, по шкале гидрофобности относительно глицина), а замена аргинина на лейцин или цистеин – к ее резкому повышению (с -14 до 97 и до 49, соответственно).

На рис. 1 изображены модели участков молекул ламина А дикого типа и ламинов с точечными мутациями с указанием гидрофобности. Выраженные отличия в форме выбранных фрагментов можно заметить в мутантных белках с повышением гидрофобности при замене *R471C*, *R482L* и *R527C*, с более заметным изменением формы при мутации *R527C*, что согласуется с данными структурного выравнивания (табл. 1). Следует также учесть изменение геометрии боковых цепей аминокислот, которое менее выражено в случае замены аргинина на лейцин *R482L* и более существенно при замене глицина на более крупный радикал аспарагиновой кислоты (*G465D*) или замене аргинина на более компактный цистеин (*R471C* и *R527C*).

Для того чтобы проследить возможные изменения во взаимодействии мутантных форм ламина с другими белками, были выбраны два его партнера с известными сайтами взаимодействия: SREBP1 и EMD. С каждым из них был проведен молекулярный докинг смоделированных мутантных ламинов и ламина дикого типа. В качестве примера приведены результаты докинга мутантного ламина *G465D* с белками-партнерами (рис. 2).

Данные расчетов общей энергии ( $E_{total}$ ) полученных комплексов дают представление о сродстве молекул и устойчивости межмолекулярных взаимодействий. Установлено, что энергия взаимодействия резко изменяется для всех мутантных белков (табл. 3), причем наиболее выражено – при замене *G465D* и *R482L*. Причем для мутации *R482L* наблюдается повышение сродства к обоим белкам-партнерам, в то время как для остальных мутантных белков сродство повышается только к SREBP1, а к эмерину – снижается.

Таблица 3.

Общая энергия ( $E_{total}$ ) комплексов исследованных форм ламина с белками-партнерами (кДж/моль, по данным HEX)

Тип мутации	<i>LMNwt</i>	<i>G465D</i>	<i>R471C</i>	<i>R482L</i>	<i>R527C</i>
Ламин-эмерин	-611,96	-555,67	-589,86	-642,71	-569,61
Ламин-SREBP1	-509,88	-603,49	-569,15	-613,79	-579,93

Следует отметить, что именно для мутации *R482L*, при которой геометрия аминокислот изменяется незначительно, выявлено наибольшее изменение гидрофобности в точке мутации. А для замены *G465D* установлены заметные изменения экспонирования заряженных аминокислот в изученном участке (табл. 2). Можно предположить, что данные характеристики являются критическими для взаимодействия ламина с белками-партнерами. Более того, известно, что с мутацией в положении 482 с аналогичным возрастанием гидрофобности (*R482W*) ассоциировано абсолютное большинство известных случаев ламинопатий ([www.umd.be/LMNA/](http://www.umd.be/LMNA/)).

Таким образом, моделирование структуры иммуноглобулин-подобного домена мутантных форм ламина выявило заметные изменения геометрии остова данной части молекулы при мутации *R527C*. Экспонирование заряженных аминокислот и профиль гидрофобности более выражено изменялись, соответственно, при мутациях *G465D* и *R482L*, что сопровождалось значительным изменением сродства к эмерину и SREBP1. Полученные в работе результаты позволяют предположить, что усиление взаимодействия ламина с обоими белками-партнерами при мутациях с резким возрастанием гидрофобности может явиться предпосылкой развития ламинопатий за счет изменения передачи сигнала при дифференцировке мезенхимальных клеток.

Таблица 2.

Экспонирование некоторых аминокислот на поверхности молекулы белка в ламине (wt\* – аминокислоты в данной позиции у ламина дикого типа, Т – поворот, S –  $\beta$  структура)

Позиция	465	471	475	481	482	483	486	487	514	515	524	527
АК	wtG	wtR	wtD	wtY	wtR	wtF	wtK	wtF	wtW	wtK	wtN	wtR
3D-укладка	T	S	T	S	S	S	T	S	S	T	T	S
Дикий тип												
G465D												
R471C												
R482L												
R527C												

Примечание:



Шкала экспонирования аминокислоты на поверхности молекулы белка: цвета слева направо – от полностью погруженных (темно-синий) до экспонированных не менее, чем на 75% (красный).

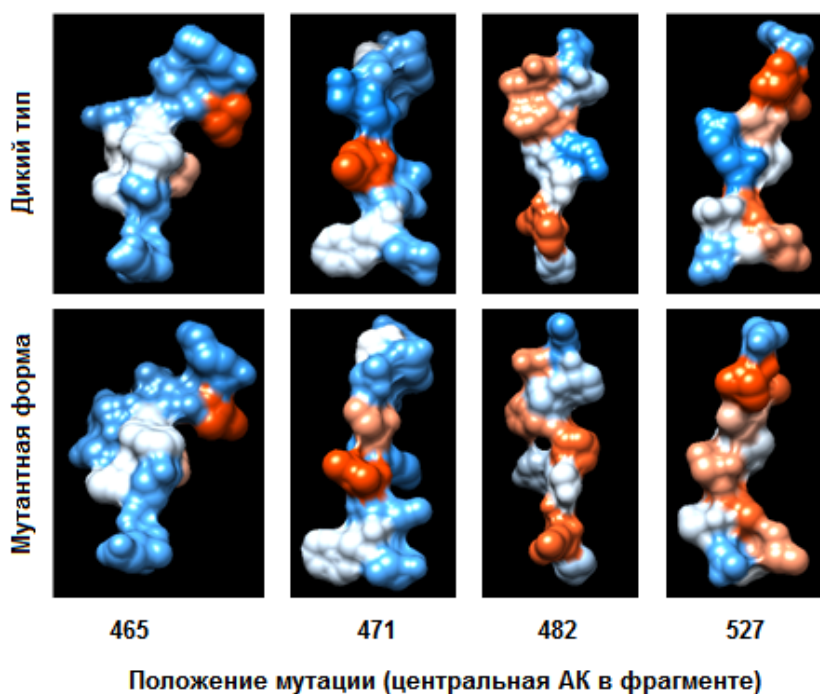


Рис. 1. Фрагменты смоделированных мутантных форм и дикого типа ламина А на 5 АК выше и ниже точки мутации (синим выделены гидрофобные участки, красным – высокогидрофильные)

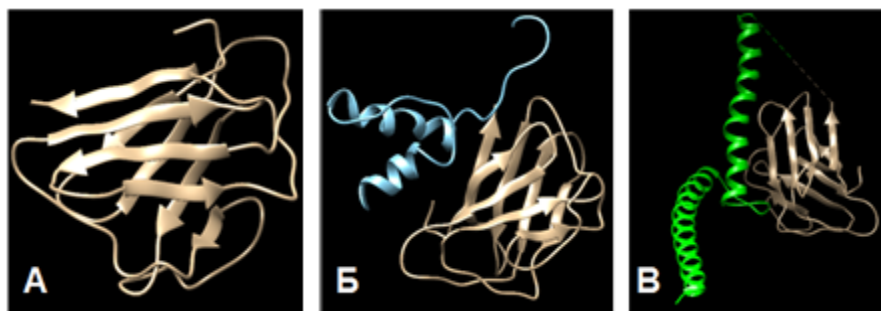


Рис. 2. А – Модель иммуноглобулин-подобного домена мутантного ламина G465D. Б – Симуляция докинга мутантного ламина G465D с фрагментом цепи EMD. В – Симуляция докинга мутантного ламина G465D с фрагментом цепи SREBP1

**Список литературы**

- Bruston F., Delbarre E., Ostlund C. et al. Loss of a DNA binding site within the tail of prelamin A contributes to altered heterochromatin anchorage by progerin // *FEBS Lett.* – 2010. – Vol.584 (14). – P. 2999–3004.
- Clements L., Manilal S., Love D., Morris G. Direct interaction between emerin and lamin A // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – Vol.267. – P. 709–714.
- Dechat T., Adam S., Taimen P. et al. Nuclear Lamins // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2010. – Vol.2 (11). – P. 1–22.
- Guelen L., Pagie L., Brasset E. et al. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions // *Nature.* – 2008. – Vol.453 (7197). – P. 948–951.
- Lloyd D., Trembath R., Shackleton S. A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies // *Hum. Mol. Genet.* – 2002. – Vol.11. – P. 769–777.
- Mattout A., Goldberg M., Tzur Y. et al. Specific and conserved sequences in *D. melanogaster* and *C. elegans* lamins and histone H2A mediate the attachment of lamins to chromosomes // *J. Cell. Sci.* – 2007. – Vol.120. – P. 77–85.
- Ritchie D.W., Venkatraman V. Ultra-fast FFT protein docking on graphics processors // *Bioinformatics.* – 2010. – Vol.26. – P. 2398–2405.
- Sakaki M., Koike H., Takahashi N. et al. Interaction between emerin and nuclear lamins // *J. Biochem.* – 2001. – Vol.129. – P. 321–327.
- Szczerbal I., Foster H.A., Bridger J.M. The spatial repositioning of adipogenesis genes is correlated with their expression status in a porcine mesenchymal stem cell adipogenesis model system // *Chromosoma.* – 2009. – Vol.118 (5). – P. 647–663.
- Zhang Y., Skolnick J. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – Vol.33 (7). – P. 2302–2309.

**Представлено: О.П.Білозоров / Presented by: A.P.Belozorov**

**Рецензент: Н.І.Буланкіна / Reviewer: N.I.Bulankina**

*Подано до редакції / Received: 02.10.2014*