

ЛИПИДОПОСРЕДОВАННЫЙ МЕХАНИЗМ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ БЕЛКОВ

© Э. В. Бочаров,^{1,*} К. В. Павлов²

¹ *Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, 117997,*

² *Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
Федерального медико-биологического агентства, Москва, 119435;*

** электронный адрес: edvbon@mail.ru*

Белки и липиды играют существенно различную, но взаимодополняющую роль в функционировании клеточных мембран. Биологически важные процессы часто опосредуются или стимулируются динамическими процессами, происходящими в липидных бислоях. Разнообразные белок-липидные взаимодействия объединяют липидный матрикс и мембранные белки в единую самосогласованную систему. Специфические взаимодействия белков с липидами хорошо изучены и описываются достаточно простыми механизмами, которые допускают экспериментальную проверку в лабораторных условиях и оценку биологической значимости. Однако целый ряд новых экспериментальных биофизических наблюдений, подтвержденных теоретическим анализом и молекулярным моделированием, предполагает существование биологически значимых белок-липидных взаимодействий более высокого порядка, учет которых помогает объяснить сложное и точно отрегулированное поведение биологических мембран. Движущие силы для такого липидопосредованного регулирования включают в себя гидрофобные и гидрофильные взаимодействия, механическую деформацию и искривление мембраны, согласующиеся друг с другом конформационные перестройки белка и изменения свойств локального липидного окружения. Как видно из примеров, проанализированных в настоящем обзоре, только некоторые из возможных видов межмолекулярных взаимодействий и биофизических механизмов задействованы в случае каждого конкретного белка и его биологической функции в мембране клетки. Рассмотрение мембранных белков как части интегрированной тонко настроенной протеолипидной системы позволяет по-новому взглянуть на взаимосвязь «структура—функция—патогенез», что необходимо для разработки новых способов молекулярно-таргетной терапии социально значимых заболеваний.

Ключевые слова: мембранный белок, битопный рецептор, рецепторные тирозинкиназы, сигнальная трансдукция, трансмембранный домен, белок-липидное взаимодействие, белок-белковое взаимодействие

Принятые сокращения: TM — трансмембранный, ECD — эктодомен или внеклеточный домен, EGF — эпидермальный фактор роста человека, GPCR — рецептор, сопряженный с G-белком, ICD — внутриклеточный домен, JM — примембранный (juxtamembrane) участок, nAChR — никотиновый ацетилхолиновый рецептор, TMD — трансмембранный домен.

Живые клетки представляют собой самоорганизующиеся, открытые диссипативные системы, поддерживаемые в термодинамически неравновесном состоянии за счет непрерывного притока вещества и отрицательной энтропии из-за постоянного противодействия непрерывному исходящему потоку рассеивающей энергии и продуктов жизнедеятельности. Плазматические мембраны клеток, а также мембраны внутриклеточных органелл обеспечивают фундаментальную предпосылку для долгосрочного существования таких стационарных неравновесных условий. Они часто описываются как селективные барьеры, защищающие низкоэнтропийную внутренность клеток от хаоса и опасностей внешнего мира. Однако выражение «барьерная функция» может вводить

в заблуждение при применении к плазматическим мембранам, роль которых заключается не столько в разделении, сколько в согласовании процессов и параметров внутренней и внешней поверхностей клетки посредством организованного действия широкого спектра связанных с мембраной белковых машин. Для того чтобы выжить, клетки должны получать и обрабатывать информацию об изменении параметров окружающей среды и реагировать гибко и точно на широкий спектр внешних раздражителей, включая механические, электрические, химические и биохимические, а также генерировать и сообщать такие стимулы. Все жизненно важные функции, включая скорости метаболических процессов, экспрессию различных факторов и морфогенез клеток, должны быть точно на-

строены в соответствии с входящими сигналами, а информация о текущем состоянии клеток должна сообщаться их коллегам, особенно в случае многоклеточных организмов.

Быстрое развитие структурных и аналитических инструментов и методов за последние десятилетия значительно расширило наше понимание процессов, связанных с биологическими функциями белков на молекулярном и субмолекулярном уровнях. По практическим соображениям до сих пор количество накопленной информации о деталях пространственной структуры и функционирования водорастворимых белков значительно превзошло имеющиеся данные об интегральных и периферических мембранных белках. Такой дисбаланс способствует сохранению популярности вышеупомянутой парадигмы, в которой липидный бислой представляет собой просто пассивное место для различных биологических функций, выполняемых высокоспецифическими молекулами белка. Однако такая парадигма оказывается значительно упрощенной, и во все большем числе примеров биологически значимые функции опосредуются или управляются процессами, происходящими в липидных бислоях. Различные белок-липидные взаимодействия объединяют липидный матрикс и отдельные мембранные белки в интегральную самосогласованную систему плазматической мембраны.

Мембранные белки и липидопосредованные взаимодействия

На основании разных оценок только α -спиральные трансмембранные (ТМ) белки составляют от 15 до 40 % протеома организма (36 % на основе анализа протеома человека (Dan et al., 2013)). Принимая во внимание периферические мембранные белки, которые занимают 20—25 % протеома (например, в *Escherichia coli* (Monje-Galvan, Klauda, 2016)), а также цитоплазматические белки, эпизодически контактирующие с мембраной, мы только начинаем понимать масштаб, роль и сложность взаимодействий белковых машин с поверхностями и внутренним пространством биологических мембран. Процессы, индуцированные, контролируемые или управляемые такими взаимодействиями, выходят далеко за пределы клеточного гомеостаза и селективного переноса вещества по границе клетки, охватывая весь спектр основных биологических функций, включая взаимопревращение энергия—энтропия, биосинтез, сенсорные функции (межклеточную сигнализацию и зондирование окружающей среды), передачу и обработку информации через зависимые от окружающих липидов так называемые перекрестные взаимодействия (от англ. cross-talk) между различными классами рецепторов, морфогенез и регуляцию жизненного цикла (пролиферацию, апоптоз, некроз и т. д.).

За каждый из этих процессов отвечают специализированные белки или группы белков, однако становится все более очевидным, что многие из белков очень чувствительны к динамически меняющейся локальной среде липидного бислоя и могут изменить конформационное и функциональное состояния в ответ даже на небольшие изменения состава или физического состояния окружающих липидов. Разнообразные и независимые данные свидетельствуют о том, что хорошо отлаженная и мобильная белковая машинерия зависит и точно регулируется хими-

ческим составом и физическим состоянием липидов в непосредственном контакте с мембранными белками или в близком окружении. Функциональное значение и универсальность белок-липидных взаимодействий можно также оценить исходя из количества различных липидов, обнаруженных в биологических мембранах, и высокой степени консервативности липидного состава, присущих различным органеллам, клеткам или тканям. Биологически значимые виды липидов различаются по многим параметрам, имеют разные полярные головы (заряд, размер и способность образовывать водородные связи), гидрофобные хвосты (количество, длина, ветвление и степень насыщенности ацильной цепи, наличие конденсированных циклов), геометрию (отношение удельных площадей головы и хвоста), температуру фазового перехода гель—жидкий кристалл (состав липидов в биологических мембранах относительно близок к температуре фазового перехода, что позволяет мембране быстро и согласованно реагировать на изменения температуры). Представляется очевидным, что использование такого широкого разнообразия конструктивных материалов только с целью строительства мембранного барьера с регулируемой проницаемостью для различных веществ было бы слишком расточительным с точки зрения эволюции.

Неполный список биологических функций, выполняемых с помощью механизмов в толще, на поверхности или при существенном участии клеточных мембран, включает в себя локомоцию и хемотаксис, передачу, усиление и обработку электрических сигналов в нейронных сетях, морфогенез костей и тканей, межклеточную коммуникацию (опосредованную аллостерической регуляцией различных ферментов и транспортеров), биосинтез и взаимопревращение между энергией и энтропией, селективный перенос ионов и метаболитов через и по границам клеток и органелл, а также иммобилизацию и селективное представление лигандов и субстратов для мембранно-ассоциированных ферментов и рецепторов на поверхности мембраны (так называемый мембранный катализ). Переход от трехмерной объемной к двумерной поверхностной топологии позволяет существенно изменить (оптимизировать) предэкспоненциальный коэффициент скорости реакции между встроенными в мембрану ферментами или рецепторами и водорастворимыми лигандами. Дело не только в том, что броуновский путь к реакционному центру короче в двумерном пространстве, но и ориентация лиганда в этом случае фиксирована (или сильно ограничена) и предориентирована для взаимодействия с белковой мишенью (собственно рецептора), вокруг которой локально образуется более упорядоченная мембранная фаза (с более равномерно ориентированными липидными головками и со специфическим липидным составом). Концепция мембранного катализа проиллюстрирована на рис. 1, а на примере ингибирования никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR) змеиным нейротоксином II, где участие такого механизма объясняет необычно быстрое действие токсина (Krabben et al., 2009; Lesovoy et al., 2009).

Многие из этих биологических функций (например, связанные с метаболизмом и сохранением гомеостаза) выполняются постоянно, в то время как другие являются спорадическими и вызываются определенными событиями в жизненном цикле клеток или значительным изменением параметров клеточной среды, таких как передача сигналов от соседних клеток, деление или слияние, а некоторые могут выполняться только один раз в течение

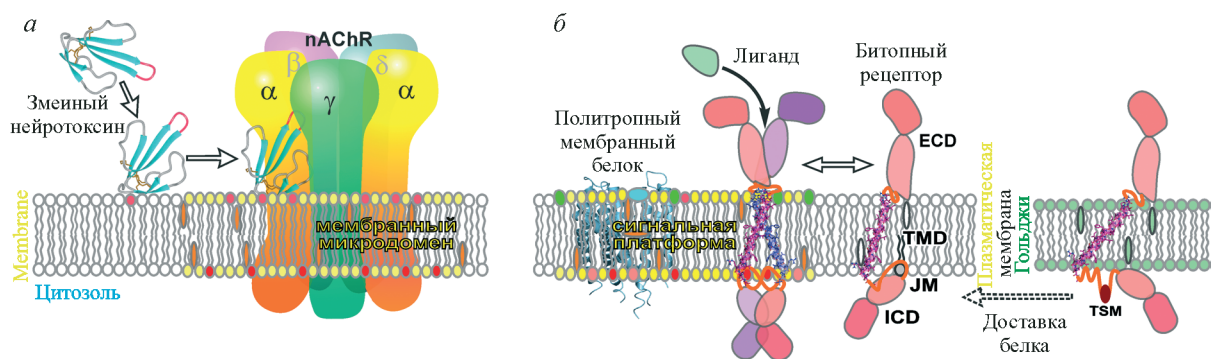


Рис. 1. Иллюстрация липидопосредованных латеральных белок-белковых взаимодействий.

а — молекулярный механизм «мембранного катализа» при ингибировании рецептора nAChR змеиным нейротоксином II (дано с изменениями согласно: Lesovoy et al., 2009); шаг 1: неспецифическая электростатическая адсорбция токсина на отрицательно заряженную поверхность мембраны вблизи микродомена (рафта); шаг 2: «заякоривание» токсина к отрицательно заряженным головкам (красный) в определенной ориентации, которая способствует распознаванию рецептора; шаг 3: боковая диффузия нейротоксина и распознавание сайта связывания между α - и γ -субъединицами nAChR. *б: слева* — функциональное сопряжение при димеризации битопного белка между механизмом белок-липидного гидрофобного несоответствия (hydrophobic mismatch) и фазовыми переходами между жидкоупорядоченной (головки липидов выделены желтым) и жидконеупорядоченной липидными фазами с разными гидрофобными толщинами мембраны и специфическим липидным составом (полярные головы специфических липидов выделены красным, голубым и светло-зеленым; холестерин показан удлиненными овалом); *справа* — посттрансляционная доставка битопного белка с учетом механизма белок-липидного гидрофобного несоответствия. ECD — внеклеточный домен, TMD — трансмембранный домен, ICD — внутриклеточный домен, JM — примембранный (juxtamembrane) участок, TSM — мотив для иницирования трафика битопного белка.

жизни клетки (как в случае оплодотворения яйцеклетки, апоптоза и некроза). Другое различие состоит в том, что, хотя некоторые функции являются двоичными процессами («да или нет») или ответами на стимулы, в других случаях существуют множественные уровни или различные дискретные результаты, выбранные клеткой на основе дополнительных факторов, не все из которых можно отследить до взаимодействия с дополнительными лигандами или регуляторными белками. Это связано со многими клеточными сигнальными путями, где рецепторы часто способны инициировать дифференцированные клеточные ответы на различные раздражители (Saito et al., 2004), или с тем же стимулом, но в зависимости от начальных условий, включая функциональное состояние других белков и мембранного окружения. Например, между трансмембранной передачей сигнала рецептором эпидермального фактора роста (EGF) и активностью Na^+/K^+ -АТФазы, по-видимому, существуют функциональная корреляция и система обратной связи (Barwe et al., 2005; Lee et al., 2015). Такую согласованную систему передачи сигналов можно приписывать конкурентному связыванию лиганда (Doerner et al., 2015), взаимодействиям с регуляторными лигандами и (или) прямым белок-белковым взаимодействиям (Rahman et al., 2015; Charlin et al., 2017). Однако некоторые случаи не поддаются таким простым объяснениям и требуют привлечения других физико-химических механизмов.

Изменение взаимодействия с окружающими липидами, модулируемое напрямую внешними раздражителями или вызванное конформационными перестройками белка, является наиболее логичным, а в некоторых случаях и единственным представимым кандидатом на роль такого механизма. Сюда прежде всего относятся специфические взаимодействия белков с липидами, которые хорошо изучены и описываются простыми механизмами, так как они поддаются достаточно точному экспериментальному моделированию и оценке значимости для биологических приложений. Однако ряд новых экспериментальных данных, подтвержденных теоретическим анализом и молекулярным моделированием, позволяет предполагать существование биологически значимых белок-липидных взаи-

модействий более высокого порядка, учет которых помогает объяснить сложное и точно отрегулированное поведение биологических мембран. Движущие силы для так называемого липидопосредованного регулирования включают в себя гидрофобные и гидрофильные взаимодействия, механические деформации и искривление мембран, согласованные конформационные перестройки белков и изменения свойств локального липидного окружения. Таким образом, липидопосредованные взаимодействия можно разделить на три следующие основные категории.

1. Гидрофобные и гидрофильные взаимодействия. Амфифильная природа молекул липидов позволяет им спонтанно организовываться в бислои. Первичные последовательности белков могут включать в себя различные комбинации заряженных, полярных и гидрофобных остатков. Повторяющиеся мотивы (паттерны) гидрофильных и гидрофобных областей на поверхности белковых молекул и липидных бислоев регулируют активность белков в различных биологических процессах, происходящих в мембранах клетки.

2. Деформационно-опосредованные взаимодействия. Частично или полностью внедряясь в липидный бислой, белки деформируют его в зависимости от свойств поверхности белка, экспонированной в мембрану. Деформации липидов могут интерферировать между собой, что должно приводить к дистанционному взаимодействию между характерными мотивами аминокислотных последовательностей белков. Эти взаимодействия могут быть достаточно сильными, чтобы вызывать изменения положения, ориентации и даже конформации мембранного белка, создавая таким образом систему обратной связи, которая может лежать в основе сложных аллостерических процессов, связанных с функционированием белка (например, трансмембранная передача сигнала).

3. Взаимодействия, связанные с фазовым разделением липидного бислоя. Плазматическая мембрана содержит более 100 видов липидов с существенным разнообразием физических и химических свойств. Эти компоненты неравномерно смешаны, и в физиологических условиях достоверно наблюдается сосуществование фаз, например

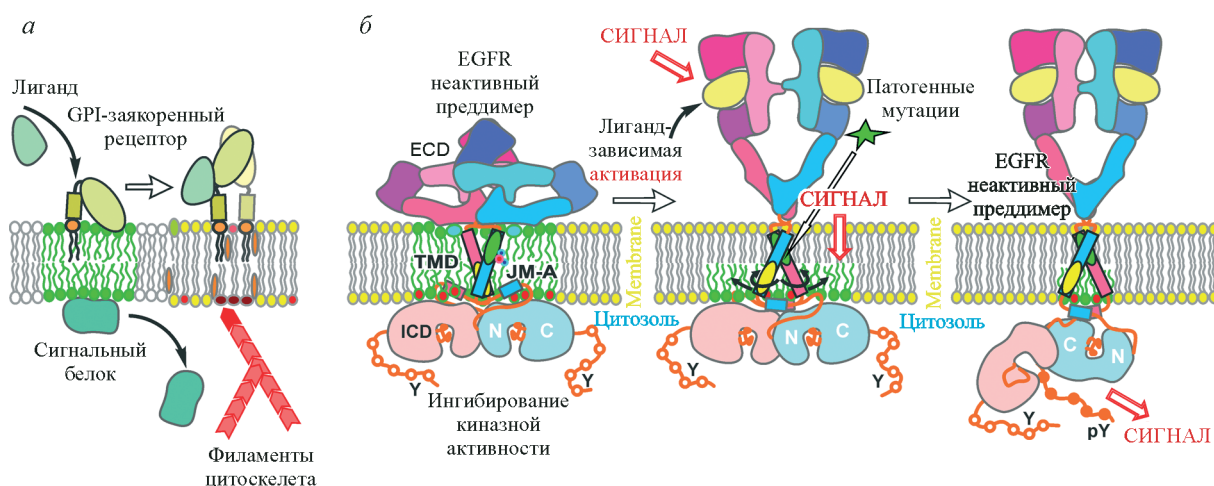


Рис. 2. Липидопосредованный механизм передачи сигнала через мембрану для GPI-заякоренных и битопных мембранных белков, предполагающий активную роль липидной среды как части самосогласованной системы сигнальной трансдукции.

a — предполагаемое липидопосредованное проведение сигнала гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-заякоренным белком на основе сопряжения локального состояния липидов между внешним и цитоплазматическим слоями мембраны (слева), а также перераспределения белка в протеолипидные микродомены (справа); гидрофобные ацильные цепи липидов в неупорядоченном (возмущенном) состоянии показаны зеленым цветом, функционально значимые специфические группы липидов выделены красным, оранжевым и коричневым цветами, молекулы холестерина показаны удлиненными овалами. *б* — последовательность (слева направо) конформационных перестроек рецептора эпидермального фактора роста человека (EGFR) и связанных с ними локальных возмущений липидного бислоя в процессе лигандзависимой активации рецептора (дано с изменениями согласно: Vocharov et al., 2016). ECD — внеклеточный домен, TMD — трансмембранный домен, ICD — внутриклеточный домен, JM-A — примембранный участок, pY — фосфорилированный остаток тирозина. Цилиндрами показаны α -спиральные участки в JM-A и TМ-сегментах. Гидрофобный и полярный димеризационные интерфейсы ТМ-домена выделены желтым и зеленым соответственно.

жидкоупорядоченной и жидконеупорядоченной (Nicolson, 2014). Большинство мембранных белков экспериментально обнаруживается в окружении жидконеупорядоченной фазы, однако происхождение такого распределения неясно: вызывает разделение фаз в подсистеме липидов перераспределение белков в соответствующее их свойствам окружение или белки индуцируют конденсацию такой определенной фазы. По сути эти два варианта не являются взаимоисключающими. Более того, когда конформационный переход белка обусловлен изменением локальных свойств липидов, взаимное влияние между белками и липидами способствует распространению таких изменений в другие области клеточной мембраны. Например, несоответствие между длиной трансмембранного домена белка и толщиной гидрофобной части бислоя может быть компенсировано локальными деформациями мембраны или локальной конденсацией жидкоупорядоченной фазы, которая, как известно, несколько толще, чем окружающая мембрана. Таким образом, согласованная система белок-липидных взаимодействий поддерживает надлежащую организацию плазматической мембраны и обеспечивает функционирование белков.

Липидопосредованные взаимодействия, по-видимому, лежат в основе сложных аллостерических процессов, связанных со способностью клеток эффективно взаимодействовать друг с другом и с окружающей средой, которая основывается на одновременном восприятии и анализе множества входящих сигналов от разных рецепторов, встроженных в плазматическую мембрану. Эти входящие сигналы могут играть определяющую роль в выборе между жизнью и смертью, непрерывно выполняемом клетками (например, получение доступа к потенциально питательному веществу или запуск апоптозного сценария), пролиферативном делении или слиянии, а также отказе реагировать на слабый сигнал. Требуемый уровень сложности обработки сигналов до-

стигается посредством организации рецепторов в кластеры более высокого порядка, часто окруженные средой высокоспецифического липидного состава, и один и тот же белок может вести себя по-разному в таких протеолипидных кластерах или вне них. Это проиллюстрировано на рис. 1, *б* в контексте фазового разделения и механизмов преимущественного перераспределения белков в упорядоченные микродомены мембраны и модуляции энергетического ландшафта конформационных подсостояний белка свойствами липидного окружения. Например, перераспределение битопного белка в жидкоупорядоченную фазу плазматической мембраны может обеспечить более точное гидрофобное соответствие, а также взаимодействие со специфическими липидами и таким образом усилить димеризацию белка с последующей его активацией из-за более высокого порядка упаковки липидов (за счет увеличения энтропийного вклада в энергию димеризации (Vocharov et al., 2012)). И наоборот, во время посттрансляционной доставки (трафика) более тонкая мембрана Гольджи (Sharpe et al., 2010) может предотвратить активацию транспортируемого белка, обнажая примембранную область белка со специфическим мотивом для инициирования трафика (He et al., 2002; Lemmon, Schlessinger, 2010).

Другой сценарий липидопосредованного взаимодействия белков приведен на рис. 2, *а*. Для гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-заякоренного рецептора показан сигнальный каскад, инициированный изменением взаимодействия лигандсвязанного рецептора с внешней поверхностью мембраны и переданный на цитоплазматическую поверхность посредством изменения локального состояния липидов (трансмонослойная корреляция локальных свойств липидной среды), который может привести к последующим событиям сигнализации на внутренней поверхности мембраны и в цитоплазме, например ремоделированию цитоскелета (Suzuki, 2015; Шаронов и др., 2016).

Роль липидопосредованных взаимодействий в передаче сигналов битопными рецепторами типа I

Учет окружающих липидов в качестве незаменимых соучастников функционирования мембранных белков важен для понимания механизмов передачи сигналов (сигнальной трансдукции) битопными рецепторами типа I, в которых сенсор (лигандсвязывающий домен) на внеклеточной стороне аллостерически связан с эффектором (например, киназным доменом) внутри клетки с помощью одной лишь трансмембранной (ТМ) спирали. При этом прямая связь между внеклеточной и внутриклеточной сторонами физически ослаблена подвижными и внутренне неупорядоченными (intrinsically disordered) (Naxholm et al., 2015; Uversky, 2015) сегментами примембранных линкерных участков, которые могут принимать различные временные конформации в зависимости от окружения. Эти рецепторы активно участвуют в перекрестных взаимодействиях в мембране, часто имеют несколько конформационных подсостояний (например, в ответ на связывание различных лигандов) и обычно для активации нуждаются в формировании функционально компетентных димеров через интерфейсы, расположенные во внеклеточной, мембранной и цитоплазматической частях рецептора. Как было показано на ряде примеров, переключение между альтернативными интерфейсами димеризации в α -спиральных ТМ-доменах лежит в основе активации рецепторов в ответ на связывание лиганда (Landaу, Ben-Tal, 2008; Vocharov et al., 2010, 2013, 2016, 2017a, 2017c; Endres et al., 2013; Sharonov et al., 2014; Maruyama, 2015; Waters, Brooks, 2015; Bragin et al., 2016; Sarabipour, Hristova, 2016).

Интерфейсы димеризации ТМ-спиралей формируются группами аминокислотных остатков, которые предпочитают взаимодействовать друг с другом, а не быть экспонированными в гидрофобное мембранное окружение. С этой точки зрения, а также принимая во внимание, что длины таких интерфейсов на ТМ-спиралях составляют от 7 до 12 остатков (Bugge et al., 2016), а типичная длина всей ТМ-спирали — около 25 остатков, существование даже одного альтернативного интерфейса димеризации налагает существенный штраф на свободную энергию, который должен быть компенсирован предпочтительными взаимодействиями оставшейся части ТМ-спирали с углеводородными хвостами окружающих липидов. Это оставляет мало возможностей для того, чтобы в ТМ-спирали имелось несколько альтернативных сайтов димеризации, что могло бы объяснить, как ТМ-часть рецептора передает различные сигналы через мембрану в ответ на разнообразные лиганды в непрерывно меняющемся окружении клетки. С другой стороны, как представитель суперсемейства рецепторных тирозинкиназ (Lemmon, Schlessinger, 2010) битопный рецептор EGF представляет собой яркий пример дифференцированной передачи сигналов, при которой белок-липидное взаимодействие играет важную роль.

Рецептор EGF способен связывать ряд различных лигандов, что приводит к различимым лигандзависимым конечным состояниям клетки (Wilson et al., 2009). Показано, что сигналы, переданные в ответ на альтернативное связывание семи факторов роста, используемых клетками млекопитающих для активации димера рецептора EGF, делятся на три различные категории, при которых передача альтернативных каскадов сигналов в цитоплазме

клетки коррелирует с образованием различных α -спиральных структур внутриклеточными примембранными сегментами JM-A (Doerner et al., 2015). Согласованные результаты экспериментов *in vivo*, *in vitro* и *in silico* дают убедительные доказательства того, что специфичность лиганда трансформируется в разную временную динамику и величину клеточного ответа посредством образования альтернативных димерных α -спиральных структур (суперспирализованных «coiled-coil» ротамеров) сегментов JM-A, различно взаимодействующих с киназными доменами и цитоплазматической поверхностью мембраны. При этом было показано, что мутации в области JM-A изменяют энергетику связывания лиганда с эктодоменом (Macdonald-Oberman, Pike, 2009). Последовательность сегмента JM-A содержит как гидрофобный спиральный интерфейс, способный образовывать суперспиральные «coiled-coil» ротамеры, так и ряд остатков, которые могут образовывать солевые мостики, что делает возможность принимать многочисленные функционально зависимые конформации (Jura et al., 2009; Doerner et al., 2015).

Однако эта модель подразумевает существование некоего механизма передачи сигналов через мембрану, так как α -спиральный ТМ-сегмент как единственная связь между лигандсвязывающим эктодоменом и киназной внутриклеточной частью сам по себе не обладает гибкостью и разнообразием допустимых конформаций, соответствующих различным лигандам. Следует отдельно отметить, что «спящий» рецептор EGF, ожидающий лиганда, тоже существует в димерной форме — так называемое преддимерное состояние, типичное для битопных рецепторов (Tao, Maruyama, 2008; Maruyama, 2015), поэтому по меньшей мере один интерфейс димеризации ТМ-сегмента должен быть неактивным. Помимо физически ограниченного пространства для размещения нескольких альтернативных интерфейсов димеризации в α -спиральной области ТМ-домена существует еще одно ограничение.

Энергетические барьеры между функционально значимыми конформационными состояниями рецептора должны быть достаточно высокими, чтобы предотвратить его спонтанную активацию, но не настолько, чтобы ослаблять чувствительность ко всем стимулам, на которые должен реагировать рецептор. Предполагаемые множественные активные димерные конформации ТМ-домена должны быть отделены друг от друга и от спящей конформации энергетическими барьерами, которые зависят от связывания лиганда и соответствуют этим ограничениям. В то же время эти различные конформации ТМ-доменов должны детерминистически индуцировать различные конформационные «coiled-coil» состояния сегмента JM-A, чтобы точно перевести специфичность лиганда в последующий конкретный клеточный ответ. Похоже, что такая конгруэнтная иерархия конформационных состояний битопного рецептора слишком сложна, чтобы осуществляться парой жестких ТМ-спиралей. С другой стороны, мембранные липиды образуют гибкую и динамичную среду с множеством переменных свойств, чувствительных к взаимодействию не только с ТМ-частью белка, но также с водорастворимыми сегментами, которые могут образовывать временные контакты с липидными головками и (или) частично заглубляться в бислой. Более того, было продемонстрировано, что подвижные участки, образующие альтернативные интерфейсы различных «coiled-coil» ротамеров внутриклеточного сегмента JM-A, имеют возможность обратимо взаимодействовать с го-

ловками липидов и (или) заглубляться в липидный бислоя (Endres et al., 2013; Mineev et al., 2015). Таким образом, в случае рецептора EGF (и ряда других тирозинкиназных рецепторов) характер конформационных перестроек, наблюдаемых при активации рецептора, указывает на белок-липидные взаимодействия, которые могут быть недостающим звеном в мини-каскаде событий, ответственных за альтернативную передачу сигнала через мембрану.

Как показано (Vocharov et al., 2016, 2017a, 2017b), димеризация через менее полярный из двух альтернативных интерфейсов ТМ-домена рецептора EGF в неактивном состоянии экспонирует второй более полярный интерфейс в гидрофобный слой мембраны. Термодинамически это должно индуцировать локальное изменение физико-химического состояния липида, увеличивая его диэлектрическую проницаемость и проницаемость для воды через изменение параметров порядка и (или) локального химического состава мембраны, чтобы соответствовать свойствам экспонированной поверхности димера ТМ-домена рецептора. Динамические свойства липидного бислоя позволяют распространять данное возмущение локальных мембранных свойств как в поперечном (транс-мембранном), так и в продольном (латеральном) направлении, обеспечивая аллостерический механизм передачи сигнала через мембрану — регуляцию состояния цитоплазматической киназной части рецептора связыванием лиганда внеклеточными доменами. Переключение на более полярный интерфейс димеризации ТМ-доменов рецептора ослабляет возмущение бислоя и увеличивает локальную гидрофобность и, следовательно, может изменить белок-липидное взаимодействие подвижных примембранных участков и киназных доменов с внутриклеточной поверхностью мембраны. Возможность такого эффекта, имеющего достаточную величину, чтобы сделать липидопосредованный механизм сигнальной трансдукции жизнеспособным, подтверждается молекулярным моделированием ТМ-доменов рецептора EGF в явно заданной мембране (Vocharov et al., 2017b, 2017c). В свою очередь корреляция между состоянием липидной среды и конформацией димера ТМ-доменов была экспериментально подтверждена, когда смена мембранного миметика (более гидрофильной детергентной мицеллы на более упорядоченную липидную бицеллу) позволила переключить моду димеризации ТМ-домена рецептора EGF из неактивного в активное состояние (Vocharov et al., 2016, 2017a). Простота модели, имитирующей мембрану, в этом случае лишь подчеркивает тот факт, что простое и довольно тонкое изменение скалярного физико-химического свойства среды липидов может вызвать функционально значимый конформационный переход мембранного белка. Механизм липидопосредованной передачи сигнала рецептором EGF (и, возможно, других тирозинкиназных рецепторов) подразумевает высвобождение из мембраны и последующую димеризацию амфифильных подвижных внутриклеточных сегментов JM-A в согласии с рассмотренной выше ролью «coiled-coil» ротамеров сегментов JM-A в дифференцированной передаче сигналов.

На рис. 2, б показан предполагаемый механизм сигнальной трансдукции рецептора EGF (Vocharov et al., 2016). До связывания лиганда взаимодействие эктодоменов рецептора с поверхностью мембраны возмущает липидный бислоя, делая его локально более полярным, что приводит к димеризации ТМ-доменов посредством гидрофобного мотива, заглублению амфифильных сег-

ментов JM-A в мембрану и в результате к ингибированию киназной активности внутриклеточных доменов. Связывание лиганда приводит к переходу эктодоменов в развернутую конформацию, ослабляя их взаимодействие с мембраной непосредственно над ТМ-доменами, что вызывает изменения локальных свойств липидного бислоя (включая повышение степени упорядоченности), которые могут распространяться через мембрану. В то же время эти изменения могут привести к тому, что ТМ-домен переключится на альтернативную N-концевую димеризацию (посредством полярного интерфейса), совместимую с более упорядоченным липидным окружением, что делает процесс сигнализации более детерминированным. Наконец, внутренняя поверхность мембраны и цитоплазматические сегменты рецептора принимают активное состояние, характеризующееся высвобождением участков JM-A из бислоя (и их последующим «coiled-coil» взаимодействием) и ассоциацией киназных доменов в асимметричный активный димер с последующим фосфорилированием по тирозину в подвижной C-концевой части рецептора. Патогенные (например, онкогенные) ТМ-мутации могут принудительно переключить димер ТМ-доменов в активную моду и, таким образом, модифицировать локальные свойства липидного бислоя с последующей активацией киназных доменов в отсутствие лиганда. Это может быть достигнуто либо путем введения SS-связей в димер ТМ-доменов, блокирующих его в активной конформации, либо путем аминокислотных замен, увеличивающих полярность интерфейса димеризации, соответствующего активному состоянию рецептора (Li, Hristova, 2010; Vocharov et al., 2013; Ou et al., 2017).

Рецепторы различных видов часто собраны вместе в так называемых сигнальных платформах на базе протеолипидных микродоменов плазматической мембраны со специфическим белковым и липидным составом (Harding, Hancock, 2008; Lingwood, Simons, 2010), что позволяет клетке согласованно обработать множество входных сигналов в результирующий ответ. На рис. 3 дается представление о возможных последствиях согласованности белок-белковых и белок-липидных взаимодействий для функционирования других мембранных белков, находящихся вместе с рецептором EGF в протеолипидных кластерах; предлагается объяснение разнообразных дискретных сигналов, обусловленных параллельными и перекрестными процессами (например, трансактивацией рецепторов), происходящими на мембране. В этом примере показано определенное распределение ролей между внутримолекулярными и межмолекулярными белковыми взаимодействиями, с одной стороны, и перегруппировкой липидного окружения и белок-липидными взаимодействиями — с другой, при выполнении и регуляции биологических функций мембранных рецепторов. Липидопосредованная трансактивация может быть дополнена вызванным структурными перестройками белков перераспределением специфически взаимодействующих редких видов липидов (конформационно-зависимое конкурентное связывание специфически взаимодействующих липидов), а также модуляцией регуляторными белками, например Ca_2^+ -кальмодулином (Sánchez-González et al., 2010) активности рецептора EGF посредством взаимодействия с его цитоплазматическими примембранными участками.

С помощью постоянно растущего арсенала экспериментальных методов, способных исследовать локальные изменения свойств среды липидов (ЭПР, ЯМР, классиче-

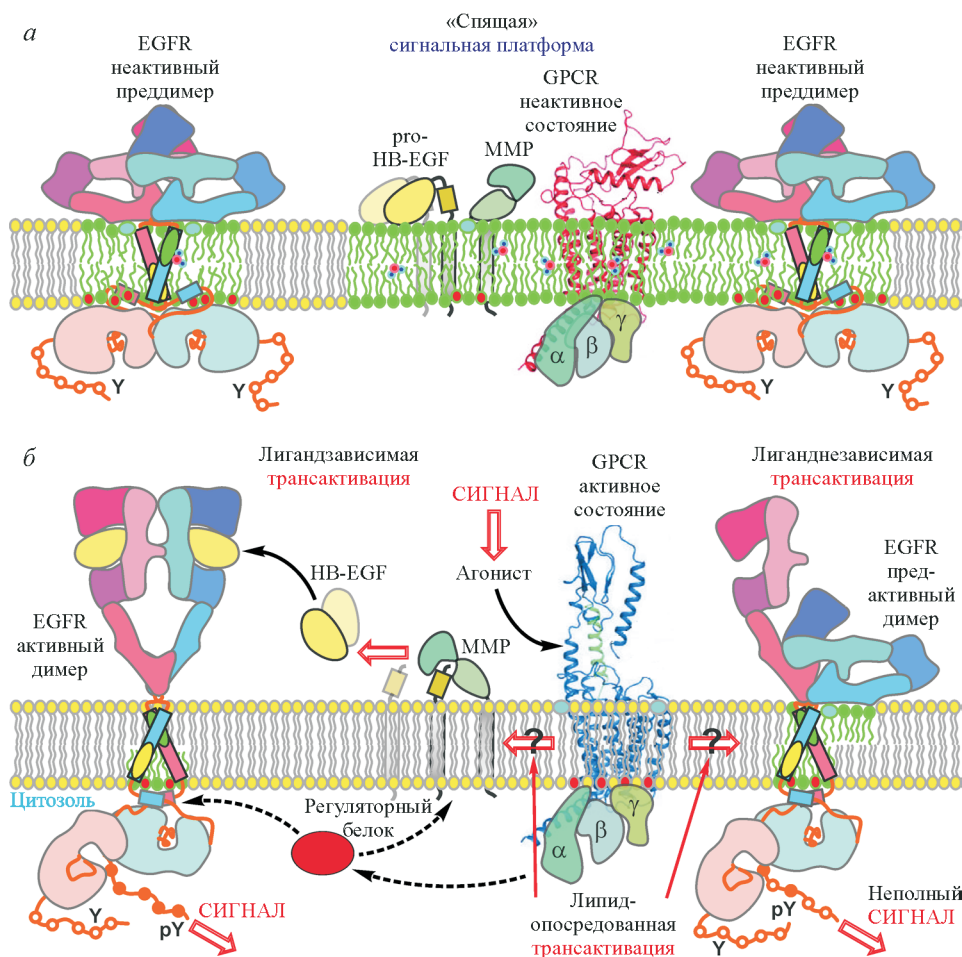


Рис. 3. Предполагаемые латеральные липидопосредованные взаимодействия между участниками сигнальной трансдукции в сигнальной платформе.

a — «спящая» сигнальная платформа со встроенным рецептором, сопряженным с G-белком (GPCR), матричной металлопротеиназой (ММР), предшественником гепаринсвязывающего эпидермального фактора роста (про-НВ-EGF) и его рецептором (EGFR). Белки совместно поддерживают «возмущенное» состояние липидов, соответствующее их спящим состояниям; схематически показанные молекулы воды могут легче проникать в возмущенную мембрану; полярные головы липидов, специфически взаимодействующих с рецепторами, окрашены в красный (отрицательно заряженные) и синий цвета. *б* — последовательность конформационных перестроек мембранных белков, индуцированных связыванием лиганда с GPCR, и связанных с ними эволюция локального состояния и состава липидного бислоя, которые могут быть ответственны за лиганднезависимую трансактивацию соседних рецепторов (*правый путь*), что приводит к ограниченной частичной сигнализации (неполному фосфорилированию киназных доменов) (Chaplin et al., 2017; Köse, 2017) или к лигандзависимой активации, опосредованной, например, белком ММР (*левый путь*).

ская флуоресцентная и FRET-FLIM-микроскопия, дифференциальная сканирующая калориметрия и ряд биохимических инструментов, таких как бифункциональные липиды), все больше парадоксов и головоломок, связанных с механизмами функционирования мембранно-ассоциированных белков, может быть разрешено. Некоторые из новых, описанных в настоящем обзоре механизмов, позволяющих согласовать взаимодействие между компонентами биологических мембран, таких как конформационно-зависимое конкурентное связывание специфически взаимодействующих липидов, являются просто правдоподобной гипотезой. В то же время некоторые другие механизмы, такие как трансмембранная сигнализация на основе трансмонослойной корреляции локальных свойств липидной среды, подкреплены убедительными, хотя и косвенными, физиологическими, экспериментальными и теоретическими данными. Независимо от того, будут ли все эти гипотезы подтверждены окончательными экспериментальными тестами, если они вдохновят экспериментатора или теоретика на лучшее понимание

биологической роли разнообразных липидопосредованных динамических процессов при функционировании белков, то авторы будут считать свои усилия вознагражденными.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00131).

Список литературы

- Шаронов Г. В., Балацкая М. Н., Ткачук В. А. 2016. Гликозилфосфатидилинозит-заякоренные белки как регуляторы примембранного цитоскелета. Биохимия. 81 (6) : 844—859. (Sharonov G. V., Balatskaya M. N., Tkachuk V. A. 2016. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins as regulators of cortical cytoskeleton. Biochemistry (Moscow). 81 : 636—650.)
- Barwe S. P., Anilkumar G., Moon S. Y., Zheng Y., Whitelegge J. P., Rajasekaran S. A., Rajasekaran A. K. 2005. Novel role for Na,K-ATPase in phosphatidylinositol 3-kinase signaling and suppression of cell motility. Mol. Biol. Cell. 16 : 1082—1094.

- Bocharov E. V., Bragin P. E., Pavlov K. V., Bocharova O. V., Mineev K. S., Polyansky A. A., Volynsky P. E., Efremov R. G., Arseniev A. S. 2017a. The conformation of the Epidermal Growth Factor Receptor transmembrane domain dimer dynamically adapts to the local membrane environment. *Biochemistry*. 56 : 1697—1705.
- Bocharov E. V., Lesovoy D. M., Goncharuk S. A., Goncharuk M. V., Hristova K., Arseniev A. S. 2013. Structure of FGFR3 transmembrane domain dimer: implications for signaling and human pathologies. *Structure*. 21 : 2087—2093.
- Bocharov E. V., Lesovoy D. M., Pavlov K. V., Pustovalova Y. E., Bocharova O. V., Arseniev A. S. 2016. Alternative packing of EGFR transmembrane domain suggests that protein-lipid interactions underlie signal conduction across membrane. *Biochim. biophys. acta*. 1858 : 1254—1261.
- Bocharov E. V., Mayzel M. L., Mineev K. S., Tkach E. N., Ermolyuk Ya. S., Schulga A. A., Arseniev A. S. 2010. Left-handed dimer of EphA2 transmembrane domain: helix packing diversity among receptor tyrosine kinases. *Biophys. J.* 98 : 881—889.
- Bocharov E. V., Mineev K. S., Goncharuk M. V., Arseniev A. S. 2012. Structural and thermodynamic insight into the process of «weak» dimerization of the ErbB4 transmembrane domain by solution NMR. *Biochim. biophys. acta*. 1818 : 2158—2170.
- Bocharov E. V., Mineev K. S., Pavlov K. V., Akimov S. A., Kuznetsov A. S., Efremov R. G., Arseniev A. S. 2017b. Helix-helix interactions in membrane domains of bitopic proteins: specificity and role of lipid environment. *Biochim. biophys. acta*. 1859 : 561—576.
- Bocharov E. V., Sharonov G. V., Bocharova O. V., Pavlov K. V. 2017c. Conformational transitions and interactions underlying the function of membrane embedded receptor protein kinases. *Biochim. biophys. acta*. 1859 : 1417—1429.
- Bragin P. E., Mineev K. S., Bocharova O. V., Volynsky P. E., Bocharov E. V., Arseniev A. S. 2016. HER2 transmembrane domain dimerization coupled with self-association of membrane-embedded cytoplasmic juxtamembrane regions. *J. Mol. Biol.* 428 : 52—61.
- Bugge K., Lindorff-Larsen K., Kragelund B. B. 2016. Understanding single-pass transmembrane receptor signaling from a structural viewpoint—what are we missing? *FEBS J.* 283 : 4424—4451.
- Chaplin R., Thach L., Hollenberg M. D., Cao Y., Little P. J., Kamato D. 2017. Insights into cellular signalling by G protein coupled receptor transactivation of cell surface protein kinase receptors. *J. Cell Commun. Signal.* 11 : 117—125.
- Dan P. D., Thuong T. T., Minh P. D., Loi D. D., Nhi N. B., Van Chi P. 2013. Analysis of the membrane proteins in human serum. *J. Proteomics Bioinform.* 6 : 296—301.
- Doerner A., Scheck R., Schepartz A. 2015. Growth factor identity is encoded by discrete coiled-coil rotamers in the EGFR juxtamembrane region. *Chem. Biol.* 22 : 776—784.
- Endres N. F., Das R., Smith A. W., Arkhipov A., Kovacs E., Huang Y., Pelton J. G., Shan Y., Shaw D. E., Wemmer D. E., Groves J. T., Kuriyan J. 2013. Conformational coupling across the plasma membrane in activation of the EGF receptor. *Cell*. 152 : 543—556.
- Harding A. S., Hancock J. F. 2008. Using plasma membrane nanoclusters to build better signaling circuits. *Trends Cell. Biol.* 18 : 364—371.
- Haxholm G. W., Nikolajsen L. F., Olsen J. G., Fredsted J., Larsen F. H., Goffin V., Pedersen S. F., Brooks A. J., Waters M. J., Kragelund B. B. 2015. Intrinsically disordered cytoplasmic domains of two cytokine receptors mediate conserved interactions with membranes. *Biochem. J.* 468 : 495—506.
- He C., Hobert M., Friend L., Carlin C. 2002. The epidermal growth factor receptor juxtamembrane domain has multiple basolateral plasma membrane localization determinants, including a dominant signal with a polyproline core. *J. Biol. Chem.* 277 : 38284—38293.
- Jura N., Endres N. F., Engel K., Deindl S., Das R., Lamers M. H., Wemmer D. E., Zhang X., Kuriyan J. 2009. Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell*. 137 : 1293—1307.
- Köse M. 2017. GPCRs and EGFR — cross-talk of membrane receptors in cancer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27 : 3611—3620.
- Krabben L., van Rossum B. J., Jehle S., Bocharov E., Lyukmanova E. N., Schulga A. A., Arseniev A., Hucho F., Oschkinat H. 2009. Loop 3 of short neurotoxin II is an additional interaction site with membrane-bound nicotinic acetylcholine receptor as detected by solid-state NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 390 : 662—671.
- Landau M., Ben-Tal N. 2008. Dynamic equilibrium between multiple active and inactive conformations explains regulation and oncogenic mutations in ErbB receptors. *Biochim. biophys. acta*. 1785 : 12—31.
- Lee S. J., Li Z., Litan A., Yoo S., Langhans S. A. 2015. EGF-induced sodium influx regulates EGFR trafficking through HDAC6 and tubulin acetylation. *BMC Cell Biol.* 16 : 24.
- Lemmon M. A., Schlessinger J. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 141 : 1117—1134.
- Lesovoy D. M., Bocharov E. V., Lyukmanova E. N., Kosinsky Y. A., Shulepko M. A., Dolgikh D. A., Kirpichnikov M. P., Efremov R. G., Arseniev A. S. 2009. Specific membrane binding of neurotoxin II can facilitate its delivery to acetylcholine receptor. *Biophys. J.* 97 : 2089—2097.
- Li E., Hristova K. 2010. Receptor tyrosine kinase transmembrane domains: function, dimer structure and dimerization energetics. *Cell Adh. Migr.* 4 : 249—254.
- Lingwood D., Simons K. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*. 327 : 46—50.
- Macdonald-Obermann J. L., Pike L. J. 2009. The intracellular juxtamembrane domain of the epidermal growth factor (EGF) receptor is responsible for the allosteric regulation of EGF binding. *J. Biol. Chem.* 284 : 13570—13576.
- Maruyama I. N. 2015. Activation of transmembrane cell-surface receptors via a common mechanism? The «rotation model». *Bioessays*. 37 : 959—967.
- Mineev K. S., Panova S. V., Bocharova O. V., Bocharov E. V., Arseniev A. S. 2015. The membrane mimetic affects the spatial structure and mobility of EGFR transmembrane and juxtamembrane domains. *Biochemistry*. 54 : 6295—6298.
- Monje-Galvan V., Klauda J. B. 2016. Peripheral membrane proteins: tying the knot between experiment and computation. *Biochim. biophys. acta*. 1858 : 1584—1593.
- Nicolson G. L. 2014. The fluid-mosaic model of membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim. biophys. acta*. 1838 : 1451—1466.
- Ou S. I., Schrock A. B., Bocharov E. V., Klempner S. J., Kawamura Haddad C., Steinecker G., Johnson M., Giltitz B. J., Chung J., Campregher P. V., Ross J. S., Stephens P. J., Miller V. A., Suh J. H., Ali S. M., Velcheti V. 2017. HER2 transmembrane mutations (V659/G660) that stabilize homo- and hetero-dimerization are rare oncogenic drivers in lung adenocarcinoma that respond to afatinib. *J. Thorac. Oncol.* 12 : 446—457.
- Rahman M. S., Akhtar N., Jamil H. M., Banik R. S., Asaduzzaman S. M. 2015. TGF- β /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Res.* 3 : 15005.
- Saito T., Okada S., Ohshima K., Yamada E., Sato M., Uehara Y., Shimizu H., Pessin J. E., Mori M. 2004. Differential activation of epidermal growth factor (EGF) receptor downstream signaling pathways by betacellulin and EGF. *Endocrinology*. 145 : 4232—4243.
- Sánchez-González P., Jellali K., Villalobo A. 2010. Calmodulin-mediated regulation of the epidermal growth factor receptor. *FEBS J.* 277 : 327—342.
- Sarabipour S., Hristova K. 2016. Mechanism of FGF receptor dimerization and activation. *Nat. Commun.* 7 : 10262.
- Sharonov G. V., Bocharov E. V., Kolosov P. M., Astapova M. V., Arseniev A. S., Feofanov A. V. 2014. Point mutations in dimerization motifs of transmembrane domain stabilize active or inactive state of the EphA2 receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 289 : 14955—14964.

Sharpe H. J., Stevens T. J., Munro S. 2010. A comprehensive comparison of transmembrane domains reveals organelle-specific properties. *Cell*. 142 : 158—169.

Suzuki K. G. 2015. New insights into the organization of plasma membrane and its role in signal transduction. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 317 : 67—96.

Tao R. H., Maruyama I. N. 2008. All EGF (ErbB) receptors have preformed homo- and heterodimeric structures in living cells. *J. Cell Sci.* 121 : 3207—3217.

Uversky V. N. 2015. The multifaceted roles of intrinsic disorder in protein complexes. *FEBS Lett.* 589 : 2498—2506.

Waters M. J., Brooks A. J. 2015. JAK2 activation by growth hormone and other cytokines. *Biochem. J.* 466 : 1—11.

Wilson K. J., Gilmore J. L., Foley J., Lemmon M. A., Riese D. J. 2009. Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: Implications for cancer. *Pharmacol. Ther.* 122 : 1—8.

Поступила 20 III 2018

LIPID-MEDIATED MECHANISMS IN PROTEIN FUNCTIONING

E. V. Bocharov,^{1,*} K. V. Pavlov²

¹ M. M. Shemyakin—Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, 117997, and ² Federal Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine of FMBA, Moscow, 119435;

* e-mail: edvbon@mail.ru

Proteins and lipids play substantially different but complementary roles in plasma membranes. Biologically significant functions are often found to be mediated or driven by dynamic processes occurring in lipid bilayers. Various protein-lipid interactions unite lipid matrix and individual membrane proteins into an integral self-consistent plasma membrane system. Specific interactions of proteins with lipids, the easiest kind to experimentally resolve and analyze for biological implication, are broadly recognized and characterized rather well. However, increasingly more compelling and diverse lines of experimental biophysical evidence corroborated by theoretical analysis and molecular modeling suggest existence and biological relevance of a higher order interactions and their ability to help in understanding of complex and finely regulated behavior of biological membranes. Examples of the driving forces for such lipid-mediated regulation include hydrophobic and hydrophilic interactions, mechanical deformation and curvature mediated interactions, concordant changes of protein conformation and lipid properties. As can be seen from the examples analyzed in the review, only a few out of the plethora of possible interaction modes and biophysical mechanisms appear to be essential in case of each particular protein and its biological function in cell membrane. Treatment of membrane proteins as parts of integrated fine-tuned proteolipid system promises new insights into «structure—function—pathogenesis» relationship and approaches to drug design for molecularly targeted therapy of socially significant diseases.

Key words: membrane protein, bitopic receptor, receptor tyrosine kinase, signal transduction, transmembrane domain, protein-lipid interaction, protein-protein interaction