

БИОЛОГИЯ
BIOLOGYУДК 577.352.4
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2023-67-1-38-40>Поступило в редакцию 19.05.2022
Received 19.05.2022**В. А. Урбан, В. Г. Вересов***Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь***СТРУКТУРНОЕ ОБОСНОВАНИЕ АКТИВАЦИИ КИНАЗЫ ZAP-70
ПРИ ФОСФОРИЛИРОВАНИИ ТИРОЗИНОВ 315, 319 И 493***(Представлено членом-корреспондентом Е. И. Слобожаниной)*

Аннотация. Тирозиновая киназа ZAP-70 (Zeta-chain-Associated Protein kinase 70) является ключевым ферментом в регуляции адаптивного иммунного ответа. Связываясь своими SH2-доменами с цитоплазматическим доменом белка CD3 ζ , ассоциированного с Т-клеточным рецептором, Zap-70 осуществляет передачу активационного сигнала к Т-лимфоцитам, индуцированного взаимодействием главного комплекса гистосовместимости с Т-клеточным рецептором. Известно, что для киназной активации ZAP-70 также необходимым является фосфорилирование тирозинов 315, 319 и 493, однако механизмы активации неясны. В настоящем исследовании использованы средства молекулярной структурной биологии для установления этих механизмов.

Ключевые слова: Т-клеточный рецептор, CD3 ζ , ITAM, ZAP-70

Для цитирования. Урбан, В. А. Структурное обоснование активации киназы ZAP-70 при фосфорилировании тирозинов 315, 319 и 493 / В. А. Урбан, В. Г. Вересов // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2023. – Т. 67, № 1. – С. 38–40. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2023-67-1-38-40>

Viktor A. Urban, Valery G. Veresov*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***STRUCTURAL BASIS OF ZAP-70 ACTIVATION UPON PHOSPHORYLATION
OF TYROSINES 315, 319 AND 493**

Abstract. ZAP-70 (Zeta-chain-Associated Protein kinase 70) is a key kinase in the regulation of the adaptive immune response. Zap-70 acts by binding its SH2-domains to the T-cell-associated CD3 ζ protein, thus transmitting a T-cell activation signal induced by the interaction of Major Histocompatibility Complex with T-cell Receptor. It has been established that for ZAP-70 kinase activation, the phosphorylation of Tyr315, Tyr319, and Tyr493 is required, however the mechanisms are unclear. In the present study, we use the tools of structural modeling to elucidate the ZAP-70 activation mechanisms.

Keywords: T-cell receptor, CD3 ζ , ITAM, ZAP-70

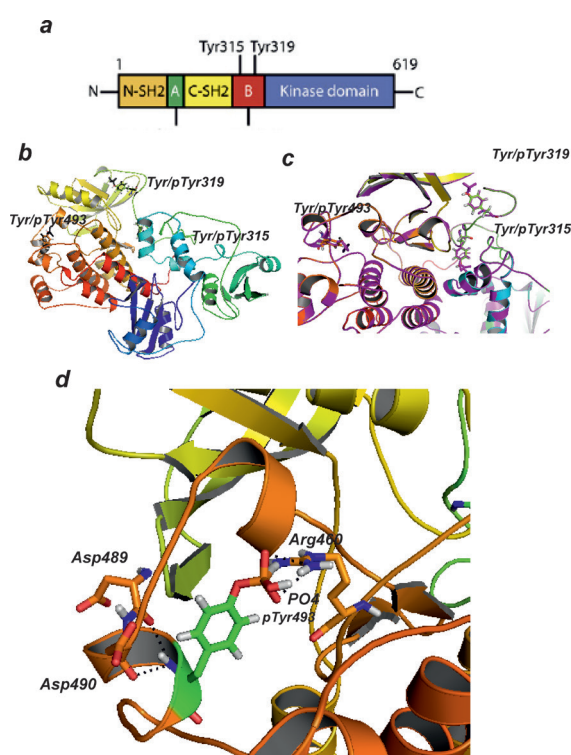
For citation. Urban V. A., Veresov V. G. Structural basis of ZAP-70 activation upon phosphorylation of tyrosines 315, 319 and 493. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2023, vol. 67, no. 1, pp. 38–40 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2023-67-1-38-40>

Введение. После связывания главного комплекса гистосовместимости (ГКГ; Major Histocompatibility Complex; МНС), экспрессированного на антиген-презентирующих клетках, с Т-клеточным рецептором (ТКР) на Т-лимфоцитах происходит фосфорилирование киназой Lck тирозинов ITAM-мотивов во внутриклеточных участках димера белка CD3 ζ , ассоциированного с ТКР, что приводит к связыванию с ITAM-мотивами тирозиновой киназы ZAP-70 и рекрутированию последней к плазматической мембране, где осуществляется фосфорилирование тирозинов Tyr315

и Tyr319 линкера между SH2-доменом и киназным доменом киназы ZAP-70, а также фосфорилирование Tyr493 между двумя N- и C-долями киназного домена, что приводит к дальнейшему распространению сигнала и в конечном итоге к активации Т-клетки [1]. До последнего времени не существовало понимания на молекулярном уровне, каким образом активируется киназный домен ZAP-70 после фосфорилирования Tyr315, Tyr319 и Tyr493. К настоящему времени установлены атомистические структуры инактивированного ZAP-70, где Tyr315 и Tyr319 заменены на фенилаланины (ZAP-70_FF) [2] (PDBID: 2OZO), а также структура ZAP-70 с нефосфорилированными Tyr315 и Tyr319 (ZAP70_YY) [3]; (PDBID: 4K2R). Однако в обеих структурах отсутствуют остатки в активационной петле киназного домена, а также Tyr315 и Tyr319 присутствовали в нефосфорилированном состоянии, что не позволяет дать структурное обоснование изменений в киназной активности при фосфорилировании остатков 315, 319 и 493 [3]. В настоящем исследовании были получены полные структуры ZAP-70 с нефосфорилированными и фосфорилированными остатками Tyr315 и Tyr319, а также промоделирована активационная петля киназного домена.

Материалы и методы исследования. Атомистическую структурную модель полноцепочечного нефосфорилированного белка ZAP-70_YY получали с использованием комбинации программы I-TASSER [4] и GalaxyRefine2 [5]. Начальную модель фосфорилированного белка ZAP-70_rY315pY319pY493 получали с использованием сервера Vienna-PTM [5] с опцией активированной минимизации. Уточнение модели фосфорилированного белка ZAP-70 осуществляли с использованием метода молекулярной динамики в рамках программного пакета GROMACS [6] и силового поля GROMOS 54a7 [7], позволяющего рассматривать фосфорилированные Tyr. Рассматривали поведение фосфорилированного ZAP-70 в NPT ансамбле на интервале 100 нс реального времени. Финальный снимок рассматривали в качестве репрезентативной структуры.

Результаты и их обсуждение. Атомистическая структурная модель белка ZAP-70, фосфорилированного по тирозинам 315, 319, 493, полученная с использованием сервера Vienna-PTM с последующим уточнением методом молекулярной динамики, и ее структурное наложение на атомистическую структурную модель нефосфорилированного белка ZAP-70 (ZAP-70_YY), полученную с использованием программ I-Tasser [4] и GalaxyRefine2 [5], приведены на рисунке (b и c). Увеличенное изображение активационного участка киназного домена приведено на рисунке d. Расчет показывает, что фосфорилированный по остаткам Tyr315, Tyr319, Tyr493 ZAP-70 стабилизирует активационную петлю киназного домена через образование водородных связей pTyr493 с Asp489 и Asp490, а также через образование солевых мостиков между pTyr493 и Arg460. Мы предполагаем, что такая стабилизация активационной петли киназного домена делает возможным последующее фосфорилирование белков LAT



Структурная модель активации ZAP-70: *a* – доменная организация ZAP-70; *b* – структурное наложение фосфорилированного и нефосфорилированного ZAP-70; *c* – увеличенное изображение структурного наложения фосфорилированного и нефосфорилированного ZAP-70; *d* – увеличенное изображение киназного домена фосфорилированного ZAP-70. Показаны pTyr493, а также Asp489, Asp490 и Arg460, образующие полярные контакты с pTyr493. Полярные контакты (водородные связи и солевые мостики), образуемые Tyr493 показаны черным пунктиром

Structural model of the ZAP-70 activation: *a* – domain organization of ZAP-70; *b* – structural superposition of phosphorylated and unphosphorylated ZAP-70; *c* – closer view of structural superposition of phosphorylated and unphosphorylated ZAP-70; *d* – closer view of the phosphorylated ZAP-70 kinase domain. Shown are: pTyr493, and Asp489, Asp490, Arg460, forming polar contacts with pTyr493. The polar contacts (H-bonds and salt bridges) that are formed by pTyr493 are shown by black dashed lines

и SLP-76 активированным киназным доменом киназы ZAP-70. В соответствии с этой моделью можно предположить, что роль фосфорилирования Tyr315 и Tyr319 заключается в разведении N-SH2 и C-SH2 доменов на расстояние, создающее топологическую комплементарность по отношению к ITAM-мотивам димера CD3 ζ , необходимое для связывания, которое приводит к рекрутированию ZAP-70 к плазматической мембране T-клетки, где осуществляется фосфорилирование Tyr493 киназой Lck.

Заключение. Проведенные расчеты позволяют заключить, что фосфорилирование Tyr493 приводит к стабилизации активационной петли киназного домена киназы ZAP-70, создавая конформацию ZAP-70, необходимую для фосфорилирования LAT и SLP-76 киназой ZAP-70

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б20-120).

Acknowledgements. The work has been sponsored by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (Grant Б20-120).

Список использованных источников

1. Mariuzza, R. A. The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma / R. A. Mariuzza, P. Agnihotri, J. Orban // *J. Biol. Chem.* – 2020. – Vol. 295, N 4. – P. 914–925. <https://doi.org/10.1074/jbc.rev119.009411>
2. Structural basis for the inhibition of tyrosine kinase activity of ZAP-70 / S. Deindl [et al.] // *Cell.* – 2007. – Vol. 129, N 4. – P. 735–746. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.039>
3. Structural basis for activation of ZAP-70 by phosphorylation of the SH2-kinase linker / Q. Yan [et al.] // *Mol. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 33, N 11. – P. 2188–2201. <https://doi.org/10.1128/mcb.01637-12>
4. Roy, A. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction / A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang // *Nat. Protoc.* – 2010. – Vol. 5, N 4. – P. 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
5. Heo, L. GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking / L. Heo, H. Park, C. Seok // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – Vol. 41, N W1. – P. W384–W388. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt458>
6. Margreitter, C. Vienna-PTM web server: a toolkit for MD simulations of protein post-translational modifications / C. Margreitter, D. Petrov, B. Zagrovic // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – Vol. 41, N W1. – P. W422–W426. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt416>
7. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit / S. Pronk [et al.] // *Bioinformatics.* – 2013. – Vol. 29, N 7. – P. 845–854. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt055>
8. A Systematic Framework for Molecular Dynamics Simulations of Protein Post-Translational Modifications / D. Petrov [et al.] // *PLOS Computational Biology.* – 2013. – Vol. 9, N 7. – Art. e1003154. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003154>

References

1. Mariuzza R. A., Agnihotri P., Orban J. The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, vol. 295, no. 4, pp. 914–925. <https://doi.org/10.1074/jbc.rev119.009411>
2. Deindl S., Kadlec T. A., Brdicka T., Cao X., Weiss A., Kuriyan J. Structural basis for the inhibition of tyrosine kinase activity of ZAP-70. *Cell*, 2007, vol. 129, no. 4, pp. 735–746. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.039>
3. Yan Q., Barros T., Vesperas P. R., Deindl S., Kadlec T. A., Weiss A., Kuriyan J. Structural basis for activation of ZAP-70 by phosphorylation of the SH2-kinase linker. *Molecular and Cellular Biology*, 2013, vol. 33, no. 11, pp. 2188–2201. <https://doi.org/10.1128/mcb.01637-12>
4. Roy A., Kucukural A., Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 2010, vol. 5, no. 4, pp. 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
5. Heo L., Park H., Seok C. GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. *Nucleic Acids Research*, 2013, vol. 41, no. W1, pp. W384–W388. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt458>
6. Margreitter C., Petrov D., Zagrovic B. Vienna-PTM web server: a toolkit for MD simulations of protein post-translational modifications. *Nucleic Acids Research*, 2013, vol. 41, no. W1, pp. W422–W426. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt416>
7. Pronk S., Páll S., Schulz R., Larsson P., Bjelkmar P., Apostolov R., Shirts M. R., Smith J. C., Kasson P. M., van der Spoel D., Hess B., Lindahl E. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*, 2013, vol. 29, no. 7, pp. 845–854. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt055>
8. Petrov D., Margreitter C., Grandits M., Oostenbrink C., Zagrovic B. A Systematic Framework for Molecular Dynamics Simulations of Protein Post-Translational Modifications. *PLOS Computational Biology*, 2013, vol. 9, no. 7, art. e1003154. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003154>

Информация об авторах

Урбан Виктор Андреевич – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: urban@ibp.org.by.

Вересов Валерий Гаврилович – д-р биол. наук, гл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: veresov@ibp.org.by.

Information about the authors

Urban Viktor A. – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: urban@ibp.org.by.

Veresov Valery G. – D. Sc. (Biology), Chief Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: veresov@ibp.org.by.