

ISSN 1561-8323 (Print)  
ISSN 2524-2431 (Online)

**БИОЛОГИЯ**  
**BIOLOGY**

УДК 577.352.4

Поступило в редакцию 16.10.2017  
Received 16.10.2017

**В. А. Урбан, А. В. Дудко, В. Г. Вересов**

*Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,  
Минск, Республика Беларусь*

**СТРУКТУРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ВЫТЕСНЕНИЯ БЕЛКА Bax  
ИЗ КОМПЛЕКСА TOM/Bax БЕЛКОМ tBid ПРИ АПОПТОЗЕ**

*(Представлено членом-корреспондентом Е. И. Слобожаниной)*

**Аннотация.** Активация белка Bax, его встраивание в наружную мембрану митохондрий и последующая олигомеризация приводят к пермеабиллизации наружной мембраны митохондрий и апоптозу. Механизмы активации белка Bax при апоптозе до настоящего времени остаются неясными. Недавно было установлено, что активация Bax иногда опосредуется его связыванием и взаимодействием с белком TOM22 комплекса TOM на наружной мембране митохондрий, однако понимание этого явления на структурном уровне до настоящего времени отсутствует. В настоящей работе установлены структурные факторы, вызывающие про-апоптотическую активацию белка Bax белком TOM22 комплекса TOM и BH3-only – белком tBid.

**Ключевые слова:** апоптоз, комплекс TOM, комплекс GIP, TOM22, Bax, tBid

**Для цитирования:** Урбан, В. А. Структурные детерминанты вытеснения белка Bax из комплекса TOM/Bax белком tBid при апоптозе / В. А. Урбан, А. В. Дудко, В. Г. Вересов // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 73–77.

**Viktor A. Urban, Hanna V. Dudko, Valery G. Veresov**

*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

**STRUCTURAL DETERMINANTS OF Bax DISPLACEMENT  
FROM THE TOM/Bax COMPLEX BY tBid DURING APOPTOSIS**

*(Communicated by Corresponding Member Ekaterina I. Slobozhanina)*

**Abstract.** Structural factors that induce the proapoptotic activation of Bax by the protein TOM22 of the TOM complex and BH3-only protein tBid are established.

**Keywords:** apoptosis, TOM-complex, GIP- complex, TOM22, Bax, tBid

**For citation:** Urban V. A., Dudko A. V., Veresov V. G. Structural determinants of Bax displacement from the TOM/Bax complex by tBid during apoptosis. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 1, pp. 73–77 (in Russian).

**Введение.** Большинство митохондриальных белков кодируется в ядре, синтезируется на цитозольных рибосомах, после чего посттрансляционно импортируется в митохондрии. Импорт в митохондрии почти всех предшественников митохондриальных белков (так называемых пред-белков) осуществляется при посредничестве транслоказы наружной мембраны митохондрий (translocase of the outer membrane – TOM), которая является комплексом, включающим семь субъединиц: поверхностные рецепторы TOM20 и TOM70, а также пять субъединиц TOM40, TOM22, TOM5, TOM6 и TOM7, образующих так называемую общую пору импорта (General

Import Pore – GIP) [1]. Было предположено, что комплекс TOM участвует в tBid-опосредованной пермеабиллизации наружной мембраны митохондрий (ПНММ) белком Вах, что приводит к выходу апоптогенных факторов, таких как цитохром с, из внутреннего митохондриального пространства в цитозоль и в конечном итоге к апоптозу [2; 3]. Однако механизмы ПНММ, опосредованной комплексом TOM и белком tBid, являются неясными, а данные – противоречивыми [4]. Недавно, базируясь на экспериментальных данных, полученных с применением крио-электронной микроскопии и кросслинкинга, и используя подходы вычислительной структурной биологии, нами была получена 3-мерная модель GIP-комплекса с атомным уровнем разрешения. В настоящем исследовании эта модель использована для установления структурных механизмов TOM-опосредованного митохондриального апоптоза.

**Материалы и методы исследования.** В настоящей работе атомистическая модель GIP-комплекса [5] вместе с подходами вычислительной структурной биологии были использованы для установления структурных факторов митохондриального апоптоза, опосредованного комплексом TOM. Так как экспериментальные данные показывают, что взаимодействие белков Вах и tBid с субкомплексом TOM40/TOM22 комплекса TOM является критическим событием в TOM-опосредованном апоптозе, сначала осуществляли моделирование атомистических 3D-структур комплексов GIP/Вах и GIP/tBid. Моделирование осуществляли применяя пятистадийный процесс, в котором на первой стадии использовали глобальный поиск оптимального расположения белков-партнеров в приближении жестких тел, а последующие четыре стадии использовали для уточнения структурных моделей, полученных на первой стадии. На первой стадии исследовали 6-мерное ротационно-трансляционное пространство с применением программы PIPER, использующей быстрое преобразование Фурье (БПФ) [6; 7]. Четыре стадии уточнения включали последовательное применение протоколов ROSETTADOCK<sub>ld</sub> [8; 9], GalaxyRefineComplex [10], ROSETTADOCK<sub>ld</sub> и ROSETTADOCK<sub>ldk</sub>. Оба протокола уточнения с использованием программы ROSETTADOCK включают переупаковку боковых цепей и используют локальный поиск в приближении «жестких твердых тел» с использованием метода Монте-Карло [8]. При использовании ROSETTADOCK<sub>ld</sub> на второй стадии процедура уточнения была применена к нескольким десяткам лучших по энергии структур, полученным на первой стадии с использованием программы PIPER. На третьей стадии использовали программу GalaxyRefineComplex, которая позволяет учитывать гибкость белков внутри белкового интерфейса, тем самым позволяя учесть конформационные перестройки при связывании [10]. Если имели место экспонированные в цитозоль петли, конформации петель первоначально уточнялись с использованием программы RosettaLoop [11], а затем применяли на третьей стадии расчетов дополнительное уточнение с использованием программы GalaxyRefineComplex. Помимо этого кластеризация структур и энергетические воронки были использованы для нахождения корректной структуры белковых комплексов. В ROSETTADOCK<sub>ld</sub> боковые цепи представлены в центроидном приближении, в то время как в ROSETTADOCK<sub>ldr</sub> используется полноатомное приближение боковых цепей, что позволяет осуществлять более тонкое уточнение. Для оценки предпочтений определенных белков-партнеров образовывать комплексы определяли аффинности связывания (средство связывания) белков. Два различных подхода были применены для оценки средства: (1) посредством использования поверхностной оценочной функции Isc протокола ROSETTADOCK<sub>ldr</sub>, а также (2) исходя из значений  $\Delta G_{Pr}$ , предоставляемого сервером PRODIGY [12]. И  $I_{sc}$  ROSETTADOCK и  $\Delta G_{Pr}$  являются оценками свободной энергии связывания, рассчитываемой как разность свободной энергии комплекса и свободной энергии белков-партнеров в несвязанном состоянии. Помимо этого оценивались такие важные факторы высокоаффинного связывания, как площадь погруженной поверхности (Buried Surface Area – BSA), геометрическая комплементарность (рассчитываемая как межмолекулярная энергия Ван дер Ваальса), количество солевых мостиков и водородных связей между взаимодействующими белками. Для установления этих факторов были использованы средства программного комплекса Rosetta3 Interface Analyzer [13] и PPCheck сервер [14].

**Результаты и их обсуждение.** При взаимодействии GIP-Вах имела место умеренная топологическая комплементарность ( $E_{VDW} = -53,9$  ккал/моль;  $BSA = 1839,1 \text{ \AA}^2$ ). Помимо этого, взаимодействие характеризовалось образованием 4 водородных связей (Glu31TOM22-Arg37Вах,

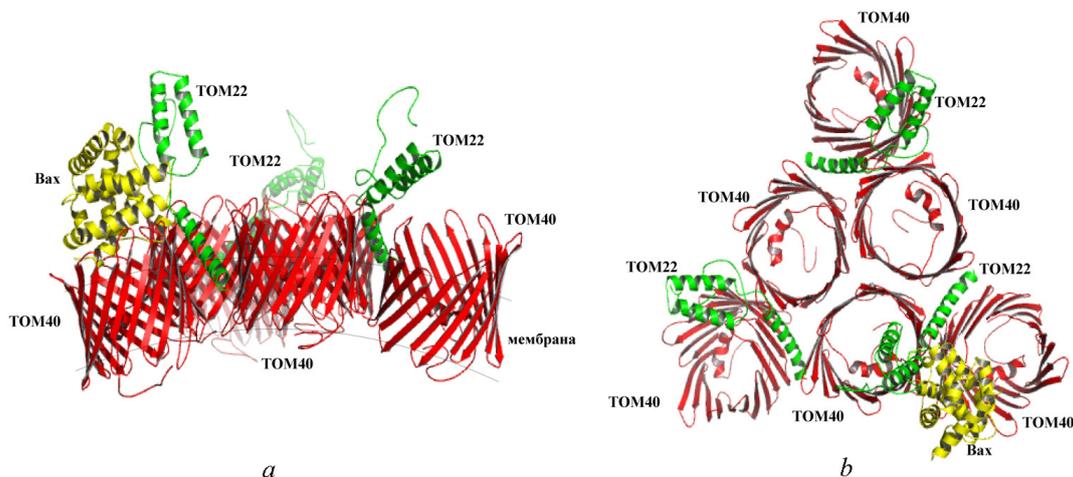


Рис. 1. Структурная модель комплекса GIP-Bax. Показаны вид сбоку (a) и вид сверху (b)  
 Fig. 1. Structural model of the GIP/Bax complex. Shown are the side view (a) and the top view (b)

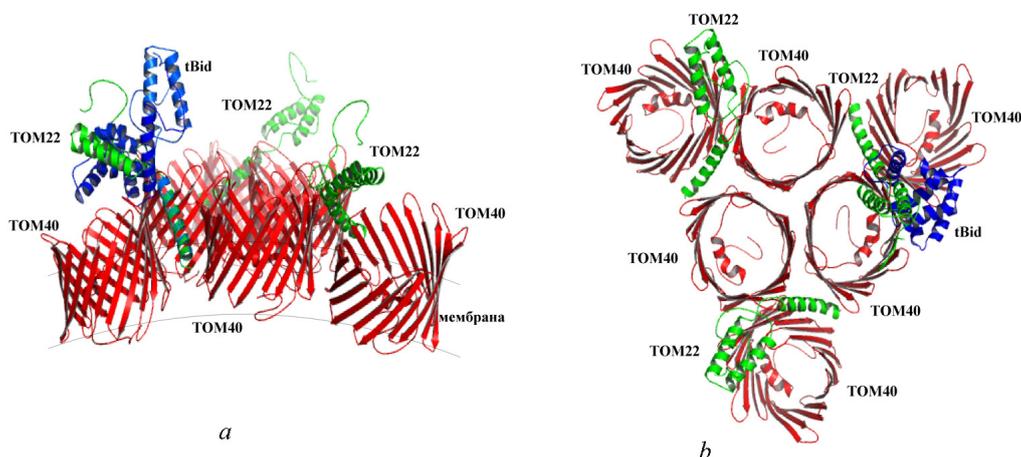


Рис. 2. Структурная модель комплекса GIP-tBid. Показаны вид сбоку (a) и вид сверху (b)  
 Fig. 2. Structural model of the GIP/tBid complex. Shown are the side view (a) and the top view (b)

Lys76TOM22-Gly39Bax, Phe80TOM22-Glu41Bax, Ser81TOM22-Glu41Bax). Все вместе приводило к низкому значению поверхностной оценочной функции ( $I_{sc} = -10,1$ ) и достаточно низкому значению  $\Delta G_{Pr} = -7,6$ , что говорит о высоком средстве связывания между комплексом GIP и белком Bax. Структура комплекса GIP-Bax представлена на рис. 1.

Существенно большая топологическая комплементарность имела место при взаимодействии GIP-tBid ( $E_{VDW} = -87,4$  ккал/моль;  $BSA = 3975,4 \text{ \AA}^2$ ). Помимо этого, взаимодействие характеризу-

**Поверхностная оценочная функция ( $I_{sc}$ ), средство связывания, полученное с использованием программы PRODIGY ( $\Delta G_{Pr}$ ), площадь погруженной поверхности (BSA), межмолекулярная энергия Ван дер Ваальса ( $E_{VDW}$ ), энергия десольватации ( $E_{desolv}$ ), число водородных связей ( $N_{hb}$ ) и солевых мостиков ( $N_{sb}$ ) для взаимодействий GIP-Bax и GIP-tBid**

**Surface scoring function ( $I_{sc}$ ), Prodigy binding affinity ( $\Delta G_{Pr}$ ), Buried Surface Area (BSA), intermolecular Van der Waals Energy ( $E_{VDW}$ ), desolvation energy ( $E_{desolv}$ ), number of hydrogen bonds ( $N_{hb}$ ), and number of salt bridges ( $N_{sb}$ ) for interactions GIP-Bax and GIP-tBid**

Пары белков-партнеров	$I_{sc}$	$\Delta G_{Pr}$	BSA, $\text{\AA}^2$	$E_{VDW}$ , ккал/моль	$E_{desolv}$ , ккал/моль	$N_{sb}$	$N_{hb}$
GIP-Bax	-10,1	-7,6	1839	-53,9	-2,3	0	4
GIP-tBid	-15,8	-12,7	3190	-87,4	1,2	4	4

валось образованием 5 водородных связей (Asp36TOM22-Arg68tBid, Asp41TOM22-Arg68tBid, Ala63TOM22-Asn62tBid, Phe80TOM22-Asp95tBid, Ser81TOM22-Asp95tBid) и 4 солевых мостиков (Glu29TOM22-Lys157tBid, Asp36TOM22-Arg68tBid, Asp36TOM22-Arg68tBid, Asp41TOM22-Arg68tBid). Все вместе приводило к очень низкому значению поверхностной оценочной функции ( $I_{sc} = -15,7$ ) и низкому значению  $\Delta G_{Pr} = -12,7$ , что говорит об очень высоком сродстве связывания между комплексом GIP и белком tBid. Структура комплекса GIP/tBid представлена на рис. 2. Наиболее важные параметры взаимодействий GIP-Вах и GIP-tBid приведены в таблице.

**Заключение.** Проведенные расчеты позволяют заключить, что при осуществлении апоптоза образующийся вследствие протеолиза белка Bid белок tBid будет вытеснять белок Вах из комплекса GIP/Вах, превращая Вах в белок, компетентный для пермеабиллизации наружной мембраны митохондрий и апоптоза.

### Список использованных источников

1. Bohnert, M. Mitochondrial machineries for insertion of membrane proteins / M. Bohnert, N. Pfanner, M. van der Laan // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2015. – Vol. 33. – P. 92–102. doi.org/10.1016/j.sbi.2015.07.013
2. TOM22, a core component of the mitochondria outer membrane protein translocation pore, is a mitochondrial receptor for the proapoptotic protein Bax / G. Bellot [et al.] // *Cell Death and Differentiation*. – 2007. – Vol. 14. – P. 785–794. doi.org/10.1038/sj.cdd.4402055
3. Veresov, V. G. Structural insights into proapoptotic signaling mediated by MTCH2, VDAC2, TOM40 and TOM22 / V. G. Veresov, A. I. Davidovskii // *Cellular Signalling*. – 2014. – Vol. 26, N 2. – P. 370–382. doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.016
4. Preprotein Transport Machineries of Yeast Mitochondrial Outer Membrane Are not Required for Bax-induced Release of Intermembrane Space Proteins / L. K. S. Szklarz [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2007. – Vol. 368, N 1. – P. 44–54. doi.org/10.1016/j.jmb.2007.01.016
5. Dudko, A. V. Cryo-electron microscopy-based Integrative atomic-resolution modeling of the TOM GIP complex [Electronic resource] / A. V. Dudko, V. G. Veresov // 8th Moscow Conference on Computational Molecular Biology, July 27–30, 2017, Moscow, Russia. – Moscow: Institute for Information Transmission Problems of the Russian Academy of Sciences (Kharkevich Institute), 2017. – Mode of access: <http://mccmb.belozersky.msu.ru/2017/proceedings/abstracts/25.pdf>
6. PIPER: an FFT-Based protein docking program with pairwise potentials / D. Kozakov [et al.] // *Proteins*. – 2006. – Vol. 65, N 2. – P. 392–406. doi.org/10.1002/prot.21117
7. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes / S. R. Comeau [et al.] // *Bioinformatics*. – 2004. – Vol. 20, N 1. – P. 45–50. doi.org/10.1093/bioinformatics/btg371
8. Protein-protein docking with simultaneous optimization of rigid-body displacement and side-chain conformations / J. J. Gray [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2003. – Vol. 331, N 1. – P. 281–299. doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00670-3
9. Lyskov, S. The RosettaDock server for local protein-protein docking / S. Lyskov, J. J. Gray // *Nucleic Acids Research*. – 2008. – Vol. 36. – P. 233–238. doi.org/10.1093/nar/gkn216
10. Heo, L. GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking / L. Heo, H. Park, C. Seok // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – Vol. 41. – P. 384–388. doi.org/10.1093/nar/gkt458
11. Mandell, D. J. Sub-angstrom accuracy in protein loop reconstruction by robotics-inspired conformational sampling / D. J. Mandell, E. A. Coutsias, T. Kortemme // *Nature Methods*. – 2009. – Vol. 6, N 8. – P. 551–552. doi.org/10.1038/nmeth0809-551
12. PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes / L. C. Xue [et al.] // *Bioinformatics*. – 2016. – Vol. 32, N 23. – P. 3676–3678. doi.org/10.1093/bioinformatics/btw514
13. Protocols for Molecular Modeling with Rosetta3 and RosettaScripts / B. J. Bender [et al.] // *Biochemistry*. – 2016. – Vol. 55, N 34. – P. 4748–4763. doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00444
14. Sukhwal, A. PPCheck: A Webserver for the Quantitative Analysis of Protein-Protein Interfaces and Prediction of Residue Hotspots / A. Sukhwal, R. Sowdhamini // *Bioinformatics and Biology Insights*. – 2015. – Vol. 9. – P. 141–151. doi.org/10.4137/bbi.s25928

### References

1. Bohnert M., Pfanner N., van der Laan M. Mitochondrial machineries for insertion of membrane proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 2015, vol. 33, pp. 92–102. doi.org/10.1016/j.sbi.2015.07.013
2. Bellot G., Cartron P.-F., Er E., Oliver L., Juin P., Armstrong L. C., Bornstein P., Mihara K., Manon S., Vallette F. M. TOM22, a core component of the mitochondria outer membrane protein translocation pore, is a mitochondrial receptor for the proapoptotic protein Bax. *Cell Death and Differentiation*, 2007, vol. 14, pp. 785–794. doi.org/10.1038/sj.cdd.4402055
3. Veresov V. G., Davidovskii A. I. Structural insights into proapoptotic signaling mediated by MTCH2, VDAC2, TOM40 and TOM22. *Cellular Signalling*, 2014, vol. 26, no. 2, pp. 370–382. doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.016
4. Szklarz L. K. S., Kozjak-Pavlovic V., Vögtle F.-N., Chacinska A., Milenkovic D., Vogel S., Dürr M., Westermann B., Guiard B., Martinou J.-C., Borner C., Pfanner N., Meisinger C. Preprotein Transport Machineries of Yeast Mitochondrial Outer

Membrane Are not Required for Bax-induced Release of Intermembrane Space Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 2007, vol. 368, no. 1, pp. 44–54. doi.org/10.1016/j.jmb.2007.01.016

5. Dudko A. V., Veresov V. G. Cryo-electron microscopy-based Integrative atomic-resolution modeling of the TOM GIP complex. *8th Moscow Conference on Computational Molecular Biology, July 27–30, 2017, Moscow, Russia*. Moscow, Institute for Information Transmission Problems of the Russian Academy of Sciences (Kharkevich Institute), 2017. Available at: <http://mccmb.belozersky.msu.ru/2017/proceedings/abstracts/25.pdf>

6. Kozakov D., Brenke R., Comeau S. R., Vajda S. PIPER: an FFT-Based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006, vol. 65, no. 2, pp. 392–406. doi.org/10.1002/prot.21117

7. Comeau S. R., Gatchell D. W., Vajda S., Camacho C. J. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*, 2004, vol. 20, no. 1, pp. 45–50. doi.org/10.1093/bioinformatics/btg371

8. Gray J. J., Moughon S., Chu Wang, Schueler-Furman O., Kuhlman B., Rohl C. A., Baker D. Protein-protein docking with simultaneous optimization of rigid-body displacement and side-chain conformations. *Journal of Molecular Biology*, 2003, vol. 331, no. 1, pp. 281–299. doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00670-3

9. Lyskov S., Gray J. J. The RosettaDock server for local protein-protein docking. *Nucleic Acids Research*, 2008, vol. 36, pp. 233–238. doi.org/10.1093/nar/gkn216

10. Heo L., Park H., Seok C. GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. *Nucleic Acids Research*, 2013, vol. 41, pp. 384–388. doi.org/10.1093/nar/gkt458

11. Mandell D. J., Coutsias E. A., Kortemme T. Sub-angstrom accuracy in protein loop reconstruction by robotics-inspired conformational sampling. *Nature Methods*, 2009, vol. 6, no. 8, pp. 551–552. doi.org/10.1038/nmeth0809-551

12. Xue L. C., Rodrigues J. P., Kastiris P. L., Bonvin A. M., Vangone A. PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes. *Bioinformatics*, 2016, vol. 32, no. 23, pp. 3676–3678. doi.org/10.1093/bioinformatics/btw514

13. Bender B. J., Cisneros A., Duran A. M., Finn J. A., Fu D., Lokits A. D., Mueller B. K., Sangha A. K., Sauer M. F., Sevy A. M., Sliwoski G., Sheehan J. H., DiMaio F., Meiler J., Moretti R. Protocols for Molecular Modeling with Rosetta3 and RosettaScripts. *Biochemistry*, 2016, vol. 55, no. 34, pp. 4748–4763. doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00444

14. Sukhwal A., Sowdhamini R. PPCheck: A Webserver for the Quantitative Analysis of Protein-Protein Interfaces and Prediction of Residue Hotspots. *Bioinformatics and Biology Insights*, 2015, vol. 9, pp. 141–151. doi.org/10.4137/bbi.s25928

### 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](mailto:urban@ibp.org.by).

*Дудко Анна Викторовна* – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [dudko@ibp.org.by](mailto:dudko@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](mailto:veresov@ibp.org.by).

### Information about the authors

*Urban Viktor Andreevich* – Junior researcher. Institute Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [urban@ibp.org.by](mailto:urban@ibp.org.by).

*Dudko Hanna Viktorovna* – Junior researcher. Institute Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [dudko@ibp.org.by](mailto:dudko@ibp.org.by).

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