

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

БИОЛОГИЯ
BIOLOGY

УДК 577.352.4
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-2-193-198>

Поступило в редакцию 04.07.2019
Received 04.07.2019

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

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

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЫСОКОАФФИННОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
БЕЛКА tBid С МИТОХОНДРИАЛЬНЫМ КОМПЛЕКСОМ MTCH2-МОАP-1**

(Представлено членом-корреспондентом Е. И. Слобожаниной)

Аннотация. Митохондриальный белок MTCH2 (mitochondrial carrier homolog 2) играет важную роль в осуществлении апоптоза, являясь рецептором для про-апоптотического белка tBid на наружной мембране митохондрий (НММ). Ранее было установлено, что белок МОАP-1 (modulator of apoptosis-1) необходим для эффективного связывания белка tBid с его рецептором на НММ, однако структурные детерминанты этой регуляции остаются неясными. В данном сообщении представлены результаты установления структурных факторов действия белка МОАP-1, обуславливающих эффективное связывание белка tBid с рецептор-подобным белком MTCH2

Ключевые слова: апоптоз, MTCH2, tBid, МОАP-1, Bax, Bak

Для цитирования: Дудко, А. В. Молекулярные механизмы высокоаффинного взаимодействия белка tBid с митохондриальным комплексом MTCH2-МОАP-1 / А. В. Дудко, В. А. Урбан, В. Г. Вересов // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 2. – С. 193–198. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-2-193-198>

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

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

**MOLECULAR MECHANISMS OF HIGH-AFFINITY INTERACTION OF THE PROTEIN tBid
WITH THE MITOCHONDRIAL COMPLEX MTCH2-MOAP-1**

(Communicated by Corresponding Member Ekaterina I. Slobozhanina)

Abstract. Mitochondrial carrier homolog 2 (MTCH2) is a protein that plays an important role in the execution of apoptosis being a receptor for tBid in the outer membrane of mitochondria. Previously, it has been shown that the binding of the modulator of apoptosis-1 (MOAP-1) protein to MTCH2 is required for the efficient MTCH2-mediated recruitment of tBid to mitochondria and, in contrast, tBid is required for the MOAP-1 recruitment to mitochondria, but the structure understanding of these phenomena is absent. In this study, we have provided structural insights into the mechanisms of regulation of the MTCH2 receptor function for tBid by MOAP-1.

Keywords: apoptosis, MTCH2, tBid, MOAP-1, Bax, Bak

For citation: Dudko H. V., Urban V. A., Veresov V. G. Molecular mechanisms of high-affinity interaction of the protein tBid with the mitochondrial complex MTCH2-MOAP-1. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2020, vol. 64, no. 2, pp. 193–198 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-2-193-198>

Введение. Апоптоз является процессом запрограммированной гибели клеток, необходимым для нормального роста и развития многоклеточных организмов. Различные сигналы, которые приводят к апоптозу, сходятся на пермеабиллизации наружной мембраны митохондрий (ПНММ). ПНММ приводит к освобождению цитохрома с и некоторых других апоптогенных белков из

межмембранного пространства митохондрий (МПМ) в цитозоль, запуская активацию каспазного каскада, что заканчивается деструкцией клетки. В многоклеточных организмах ПНММ контролируется проапоптотическими и антиапоптотическими белками большого семейства белков, известного как семейство белков Bcl-2, однако точные механизмы их действия до настоящего времени остаются в значительной степени невыясненными [1].

Установлено, что для осуществления апоптоза необходим перенос белка tBid (truncated BH3-interacting domain death agonist) к наружной мембране митохондрий (НММ), где он индуцирует активацию основных эффекторов апоптоза – белков Bak (BCL-2-homologous antagonist/killer) и Bax (BCL-2-associated X), что приводит к ПНММ [2]. При действии апоптотических стимулов белок Bid, принадлежащий к подсемейству BH3-only белков семейства Bcl-2 (имеющих гомологию с белком Bcl-2 по домену BH3), протеолизуется каспазой-8 до своей активной формы, белка tBid (truncated Bid). Последующее рекрутирование белка tBid к НММ, которое опосредуется рецептором МТСН2 на наружной мембране митохондрий, является критическим шагом в осуществлении апоптоза эффекторными белками Bak и Bax. Модулятор апоптоза-1 (МОАР-1) является короткоживущим белком, конститутивно регулируемым убиквитин-протеосомальной системой (УПС). Апоптотические стимулы стабилизируют МОАР-1, блокируя процесс его полиубиквитинирования. С использованием техники рекомбинантных белков было показано, что индукция Bax-опосредованной ПНММ белком tBid нарушается в клетках, лишенных МОАР-1, а клетки мышей с дефицитом по МОАР-1 становятся устойчивыми к FAS-индуцируемому апоптозу и летальности, позволяя предположить, что МОАР-1 является критическим компонентом апоптоза, играющим решающую роль в связывании белка tBid с белком МТСН2 [3].

Вместе с тем понимание на атомистическом структурном уровне действия МОАР-1 отсутствует. В настоящей работе осуществлено исследование структурных механизмов взаимодействия между белками МТСН2, МОАР-1 и (Bid) tBid с использованием подходов атомистического структурного моделирования. Было осуществлено моделирование 3D-структуры комплекса МТСН2/Bid, образование которого в неапоптотических клетках было предположено ранее [4; 5], а также моделирование атомистических 3D-структур комплексов МТСН2/tBid, МТСН2/tBid/МОАР-1, МТСН2/МОАР-1, МТСН2/МОАР-1/tBid, образование которых предположительно происходит в процессе апоптоза.

Материалы и методы исследования. Атомистические структурные модели белков МТСН2 и МОАР-1 были построены с использованием двухстадийного I-TASSER-GalaxyRefine протокола (ITG). На первой стадии был использован подход «итерационной сборки фрагментов, полученных методом структурного протягивания» I-TASSER [6] (iterative threading assembly refinement), который использует структурные шаблоны, получаемые метасервером LOMETS путем «структурного протягивания». На второй стадии модели для МТСН2 и МОАР-1, которые были получены с применением подхода I-TASSER, были подвергнуты процедуре уточнения с помощью программы GalaxyRefine [7], использующей сопряжение молекулярной динамики с техникой «имитационного отжига». Пространственную ориентацию МТСН2 в липидном бислое определяли с помощью PPM-сервера [8], который использует базу данных OPM (Orientations of Proteins in Membrane Database) ориентации мембранных белков в липидном бислое. Атомистические 3D-структуры комплексов генерировали, применяя трехстадийный протокол молекулярного докинга PIPER-GalaxyRefineComplex – ROSETTADOCK (PG_{RC}-подход).

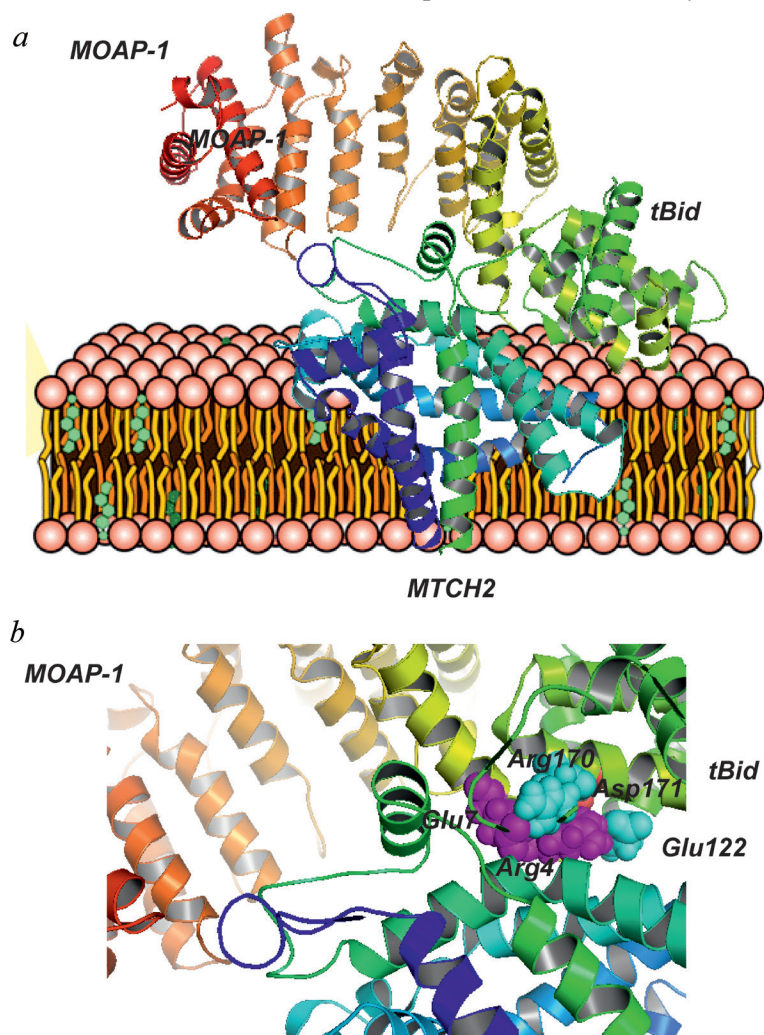
На первой стадии белки рассматривали как жесткие тела и осуществлялся глобальный 6D-поиск в трансляционном и ротационном пространстве возможных ориентаций белков-партнеров (так называемых возможных структурных решений) с применением программы PIPER [9], которая осуществляет глобальный жесткий поиск возможных структурных решений, используя трехмерное быстрое преобразование Фурье. На второй и третьей стадиях осуществляли уточнение структур белков с учетом гибкости их боковых цепей и основной цепи.

Программа GalaxyRefineComplex [10] комбинирует переупаковку боковых цепей остатков в области интерфейса, используя метод Монте Карло с последующей релаксацией структуры комплекса методом молекулярной динамики. Если в области интерфейса находились поверхностные петли, то перед применением программы GalaxyRefineComplex их структура уточня-

лась с использованием программы кинематического замыкания петель программного комплекса Rosetta [11].

Помимо этого, кластеризация структур и воронки энергетического ландшафта были использованы для нахождения корректной структуры белковых комплексов с помощью двух опций программы RosettaDock: ROSETTADOCK_{ld} и ROSETTADOCK_{dir} [12]. В первом случае боковые цепи представлены в центроидном приближении, в то время как в ROSETTADOCK_{dir} используется полноатомное рассмотрение боковых цепей, что позволяет осуществлять более тонкое уточнение.

Для оценки предпочтений определенных белков-партнеров образовывать комплексы определяли аффинности связывания (сродство связывания) белков. Два различных подхода были применены для оценки сродства: (1) посредством использования поверхностной оценочной функции Isc протокола ROSETTADOCK_{dir} [12], а также, (2) исходя из значений ΔG_{pr} , предоставляемого сервером PRODIGY [13]. И Isc ROSETTADOCK и ΔG_{pr} являются оценками свободной энергии связывания, рассчитываемой как разность свободной энергии комплекса и свободной энергии белков-партнеров в несвязанном состоянии. Помимо этого, оценивали такие важные дескрипторы 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



Структурная модель комплекса МТСН2/МОАР-1/тВид в мембранном окружении. Приведено изображение полного комплекса (а) и увеличенное изображение интерфейса между белками МОАР-1 и тВид (б)

Structural model of the MTCH2/MOAP-1/tBid complex. Shown are the distant view of the entire complex (a) and the closer view of the interface between MOAP-1 and tBid (b)

белками. Для установления этих факторов были использованы средства программного комплекса Rosetta3 Interface Analyzer [14] и PPCheck сервер [15].

Результаты и их обсуждение. Расчеты показали, что в комплексе МТСН2-Bid белок Bid образовывал два солевых мостика и три водородных связи с МТСН2. При этом два белка-партнера обладали значительной геометрической комплементарностью ($BSA = 2902 \text{ \AA}^2$, $Evdw = -75,0$ ккал/моль). Вместе это приводило к высокому средству связывания ($I_{sc} = -12,8$; $\Delta G_{pr} = -12,0$ ккал/моль). Что касается взаимодействия МТСН2-tBid, то только 2 полярных контакта были образованы, а также имела место более низкая геометрическая комплементарность ($BSA = 2223,4 \text{ \AA}^2$, $Evdw = -51,56$ ккал/моль), что обусловило более низкое связывающее средство между белками МТСН2 и tBid ($I_{sc} = -9,4$; $\Delta G_{pr} = -8,8$ ккал/моль) по сравнению с взаимодействием МТСН2-Bid. Расчеты также показали, что связывание МОАР-1 с МТСН2 приводит к образованию комплекса, обладающего высокой геометрической комплементарностью к белку tBid ($BSA = 3448,93 \text{ \AA}^2$, $\Delta VDWS_{PPCheck} = -88,23$ ккал/моль). Помимо этого между белком tBid и комплексом МТСН2/МОАР-1 было обнаружено образование шести межбелковых солевых мостиков, что вместе с высокой геометрической комплементарностью обусловило высокое средство связывания ($I_{sc} = -12,473$; $\Delta G_{pr} = -12,0$ ккал/моль). Значительно большие геометрическая и полярная комплементарности белка tBid по отношению к комплексу МТСН2/МОАР-1 по сравнению с соответствующими характеристиками взаимодействия tBid с изолированным МТСН2 позволяют объяснить на структурном уровне стимулирующий эффект МОАР-1 на перенос tBid к наружной мембране митохондрий. Рассчитанная структура комплекса МТСН2/МОАР-1/tBid в мембранном окружении показана на рисунке. Наиболее важные параметры взаимодействий между белками МТСН2, МОАР-1 и tBid приведены в таблице.

Значение оценочной функции поверхностной энергии ROSETTADOCK (I_{sc}), связывающее средство Prodigy (ΔG_{pr}), площадь погруженной поверхности (BSA), Ван дер Ваальсова энергия межбелкового взаимодействия, оцениваемая программой PPCheck, число межмолекулярных солевых мостиков (N_{sb}) и водородных связей (N_{hb}) для моделей комплексов МТСН2 с Bid и tBid; для комплекса МТСН2/tBid с МОАР-1; и для комплекса МТСН2/МОАР-1 с tBid

The ROSETTADOCK interface energy scores (I_{sc}), Prodigy binding affinity (ΔG_{pr}), Burried Surface Area (BSA), PPCheck van der Waals interaction energy score ($\Delta VDWS_{PPC}$), number of intermolecular salt bridges (N_{sb}) and intermolecular hydrogen bonds (N_{hb}) for the highest-ranked complexes of МТСН2 with Bid и tBid; МТСН2/tBid with МОАР-1 and МТСН2/МОАР-1 with tBid

Белковые комплексы Protein complexes	I_{sc}	ΔG_{pr} , ккал/моль	BSA, \AA^2	$\Delta VDWS_{PPCheck}$, ккал/моль	N_{sb}	N_{hb}
МТСН2-Bid	-12,0	-12,0	2902,0	-75,0	2	3
МТСН2-tBid	-9,4	-8,8	2223,4	51,56	0	2
МТСН2-МОАР-1	-8,9	-10,2	4009,5	-63,0	1	0
МТСН2/МОАР1-tBid	-12,5	-12,0	3448,93	-88,23	6	2

Заключение. Проведенные расчеты позволяют заключить, что белок МОАР-1, связываясь с белком МТСН2 образует комплекс МТСН2/МОАР-1, обладающий высокой полярной и геометрической комплементарностью к белку tBid, тем самым обеспечивая эффективную доставку последнего к наружной мембране митохондрий при апоптозе.

Список использованных источников

1. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy / P. E. Czabotar [et al.] // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2014. – Vol. 15, N 1. – P. 49–63. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>
2. Martinou, J. C. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics / J. C. Martinou, R. J. Youle // Dev. Cell. – 2011. – Vol. 21, N 1. – P. 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.017>
3. MOAP-1 Mediates Fas-Induced Apoptosis in Liver by Facilitating tBid Recruitment to Mitochondria / C. Tan [et al.] // Cell Rep. – 2016. – Vol. 16, N 1. – P. 174–185. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.068>
4. Veresov, V. G. Structural insights into proapoptotic signaling mediated by МТСН2, VDAC2, TOM40 and TOM22 / V. G. Veresov, A. I. Davidovskii // Cellular Signalling. – 2014. – Vol. 26, N 2. – P. 370–382. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.016>

5. BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane / Z. T. Schug [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2011. – Vol. 18, N 3. – P. 538–548. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.135>
6. Roy, A. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction / A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang // *Nat. Protocols.* – 2010. – Vol. 5, N 3. – P. 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
7. Heo, L. GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking / L. Heo, H. Park, C. Seok // *Nucleic Acids Research.* – 2013. – Vol. 41, N W1. – P. W384–W388. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt458>
8. OPM: orientations of proteins in membranes database / M. A. Lomize [et al.] // *Bioinformatics.* – 2006. – Vol. 22, N 5. – P. 623–625. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btk023>
9. PIPER: an FFT-Based protein docking program with pairwise potentials / D. Kozakov [et al.] // *Proteins.* – 2006. – Vol. 65, N 2. – P. 392–406. <https://doi.org/10.1002/prot.21117>
10. Heo, L. GalaxyRefineComplex: Refinement of protein-protein complex model structures driven by interface repacking / L. Heo, H. Lee, C. Seok // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6, N 1. – P. 32153. <https://doi.org/10.1038/srep32153>
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. <https://doi.org/10.1038/nmeth0809-551>
12. Protein-protein docking with simultaneous optimization of rigid-body displacement and side-chain conformations / J. J. Gray [et al.] // *J. Molecular Biol.* – 2003. – Vol. 331, N 1. – P. 281–299. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00670-3](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00670-3)
13. 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. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw514>
14. Protocols for Molecular Modeling with Rosetta3 and RosettaScripts / B. J. Bender [et al.] // *Biochemistry.* – 2016. – Vol. 55, N 34. – P. 4748–4763. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00444>
15. 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. <https://doi.org/10.4137/bbi.s25928>

References

1. Czabotar P. E., Lessene G., Strasser A., Adams J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, vol. 15, no. 1, pp. 49–63. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>
2. Martinou J. C., Youle R. J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Developmental Cell*, 2011, vol. 21, no. 1, pp. 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.017>
3. Tan C. T., Zhou Q.-L., Su Y.-C., Fu N. Y., Chang H.-C., Tao R. N., Sukumaran S. K., Baksh S., Tan Y.-J., Sabapathy K., Yu C.-D., Yu V. C. MOAP-1 Mediates Fas-Induced Apoptosis in Liver by Facilitating tBid Recruitment to Mitochondria. *Cell Reports*, 2016, vol. 16, no. 1, pp. 174–185. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.068>
4. 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. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.016>
5. Schug Z. T., Gonzalez F., Houtkooper R. H., Vaz F. M., Gottlieb E. BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane. *Cell Death & Differentiation*, 2011, vol. 18, no. 3, pp. 538–548. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.135>
6. Roy A., Kucukural A., Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 2010, vol. 5, no. 3, pp. 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
7. 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>
8. Lomize M. A., Lomize A. L., Pogozheva I. D., Mosberg H. I. OPM: orientations of proteins in membranes database. *Bioinformatics*, 2006, vol. 22, no. 5, pp. 623–625. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btk023>
9. 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. <https://doi.org/10.1002/prot.21117>
10. Heo L., Lee H., Seok C. GalaxyRefineComplex: Refinement of protein-protein complex model structures driven by interface repacking. *Scientific Reports*, 2016, vol. 6, no. 1, pp. 32153. <https://doi.org/10.1038/srep32153>
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. <https://doi.org/10.1038/nmeth0809-551>
12. Gray J. J., Moughon S., Wang C., 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. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00670-3](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00670-3)
13. 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. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw514>
14. 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. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00444>
15. 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. <https://doi.org/10.4137/bbi.s25928>

Информация об авторах

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.

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

Dudko Hanna V. – 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: dudko@ibp.org.by.

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.