

В. В. Побойнев

О ПЕРСПЕКТИВАХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПРИОННОГО ПЕПТИДА СС36 В КАЧЕСТВЕ ВАКЦИННОГО АНТИГЕНА ПРОТИВ ПРИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Научный руководитель: канд. биол. наук, доц. Хрусталёв В. В.

Кафедра общей химии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

Резюме. Синтетический пептид СС36 содержит бета-шпильку, состоящую из двух бета-тяжей. Пептид СС36 или его аналоги с другими значениями pI могут быть рассмотрены в качестве кандидатов для разработки вакцины против прионных заболеваний.

Ключевые слова: синтетический пептид, прионный белок, спектр кругового дихроизма, аминокислотная замена, бета-шпилька.

V. V. Poboinev

ON THE PERSPECTIVES OF THE USAGE OF SYNTHETIC PRION PEPTIDE CC36 AS A VACCINE ANTIGEN AGAINST PRION DISEASES

Tutor: associate professor V. V. Khrustalev

Department of general chemistry

Belarusian State Medical University, Minsk

Resume. Synthetic peptide CC36 contains a beta-hairpin, consisting of two beta-strands. The CC36 peptide or its analogs with other pI values can be considered as candidates for the development of a vaccine against prion diseases.

Keywords: synthetic peptide, prion protein, circular dichroism spectrum, amino acid replacement, beta hairpin.

Актуальность. Актуальность данной работы связана с тем, что прионные заболевания являются неизлечимыми, также не существует никакой иммунопрофилактики от этих заболеваний [1]. Данные заболевания связаны с переходом нормальной формы прионного белка (PrP^C) в патологическую (PrP^{Sc}), что сопровождается резким ростом содержания в ней бета-структуры и агрегацией [2, 3]. Хотя известны и другие белки, которые могут совершать такой структурный переход и формировать агрегаты, прионный белок имеет уникальную особенность, которая заключается в том, что патологическая форма прионного белка индуцирует структурный переход альфа-спиралей в нормальном прионном белке в бета-тяжи, формируя при этом агрегаты [4].

Цель: определение возможности использования синтетического пептида СС36 в качестве антигена при создании вакцины от прионных заболеваний.

Материалы и методы. Для автоматического твёрдофазного синтеза пептида СС36 был использован синтезатор “Symphony”. Контроль качества осуществлялся с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (Agilent 1200) и масс-спектрометрии (Shimadzu LCMS-2010). Спектр кругового дихроизма был получен с помощью спектрографа Jasco J-815. Анализ спектров кругового дихроизма произведён с помощью программы CAPITO. Спек-

тры флюоресценции были получены при помощи флюориметра “Solar CM2230”. Спектры кругового дихроизма и флюоресценции были измерены при разных температурах с целью обнаружения структурных переходов. Спектры кругового дихроизма получены при температурах от 5°C до 80°C при шаге в 5°C. Спектры флюоресценции получены при температурах от 28°C до 53°C при шаге в 1°C. Для предсказания вторичной структуры пептидов использовался оригинальный алгоритм “PentaFOLD.xlsx”. Для 3D моделирования пептида использовался сервер PEP-FOLD.

Результаты и их обсуждение. После изучения предсказанной вторичной структуры большого прионного белка человека с помощью оригинального алгоритма PentaFOLD мы предположили, что комбинация аминокислотных остатков во второй альфа-спирали стабилизирует её вторичную структуру, а взаимодействие с другими частями прионного белка, в частности с третьей альфа-спиралью, должно способствовать переходу второй альфа-спирали в бета-тяж. Так как эффект от иммунизации против прионных заболеваний заключается в том, чтобы вырабатывались антитела к бета-структурной форме прионного белка, что будет препятствовать формированию агрегатов и превращению альфа-спирального прионного белка в патологическую форму, то вакцинный пептид должен содержать фрагмент аминокислотной последовательности, который обладает наибольшей склонностью к альфа-бета переходу. В результате предварительной биоинформатической работы был сконструирован пептид CC36, содержащий C-конец второй альфа-спирали и N-конец третьей альфа-спирали прионного белка. В синтетическом пептиде CC36 присутствуют четыре аминокислотные замены: Phe20 на Trp20, Met28 на Arg28, Val32 на Arg32 и Val2 на Pro2 (рисунок 1). Первая замена сделана для введения флюоресцентной метки, необходимой для проведения экспериментов *in vitro*. Все остальные аминокислотные замены были сделаны вынуждено, так Met28 заменён на Arg28, а Val32 заменён на Arg32 с целью не допустить образования межмолекулярной бета-структуры во время твёрдофазного синтеза пептида: N-концы некоторых цепей становились недоступным для связывания с новыми аминокислотами [4]. На N-конце пептида Val2 заменён на Pro2 с целью повышения вероятности формирования дисульфидной связи между Cys1 и Cys36.

После обработки полученных спектров кругового дихроизма пептида CC36, выполненной с помощью программы CAPITO, установлено, что 15% аминокислотных остатков имеют альфа-спиральную конформацию, 37% – образуют бета-тяжи, 48% – имеют неструктурированное состояние (рисунок 1).

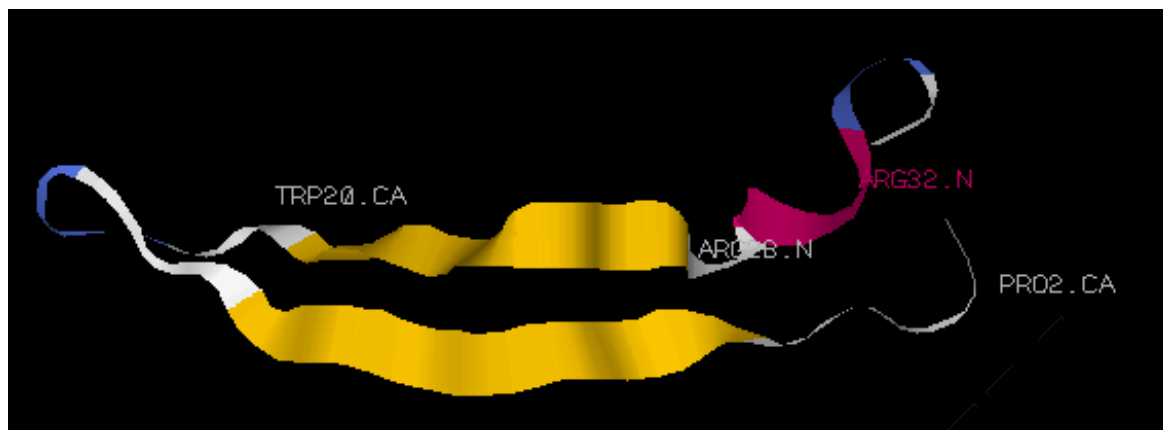


Рисунок 1 – Наиболее вероятная модель пептида СС36, полученная с помощью сервера PEP-FOLD. Жёлтый цвет – бета-шпилька, розовый – спираль 3/10, белый – неструктурированное состояние

Термический анализ пептида СС36, осуществлённый под контролем спектров кругового дихроизма, показал, что содержание различных элементов вторичной структуры остаётся неизменным в изучаемом диапазоне температур (от 5°C до 80°C). А с помощью спектров флюоресценции был найден структурный переход между 31°C и 37°C. Однако данный структурный переход не связан с изменением содержания вторичной структуры в пептиде (переходы по спектру КД отсутствуют). Используя уравнение Вант-Гоффа (изобару) показано, что энтальпия такого структурного перехода достаточно высока (685 кДж/моль). Поэтому мы выдвинули гипотезу, согласно которой при более низких температурах пептид СС36 образует олигомеры, тогда как при более высоких температурах эти олигомеры диссоциируют. А с помощью нативного геля электрофореза было установлено, что пептид СС36 образует гексамеры.

Заключение. Синтетический пептид СС36 по результатам анализа спектра кругового дихроизма при рН=5,4 имеет в своём составе бета-шпильку и короткий спиральный фрагмент. В большом прионном белке дикого типа и в области, состоящей из полных второй и третьей альфа-спиралей, можно ожидать образование более длинной бета-шпильки, чем в пептиде СС36. Существование изучаемого пептида в виде ассоциатов (гексамеров), которые диссоциируют при 37°C, может быть благоприятным фактором для выработки иммунного ответа на его антигенные фрагменты. Теоретически, пептид СС36 или его аналоги с другими значениями рI, можно рассматривать в качестве кандидата для разработки вакцины против прионных заболеваний. Повышения растворимости пептида при рН=7,4 можно добиться разными путями: внесением дополнительных аминокислотных замен либо связыванием с необходимым белком-носителем.

Информация о внедрении результатов исследования. По результатам настоящего исследования опубликовано: 1 статья в сборнике материалов, 1 статья в международном рецензируемом журнале, 1 тезисы доклада, получено 3 акта внедрения в образовательный

процесс (кафедра общей химии БГМУ, кафедра биоорганической химии БГМУ, кафедра биологии БГМУ).

Литература

1. Побойнев, В. В. Установление структуры прионного пептида СС36 по данным анализа спектра кругового дихроизма / В. В. Побойнев // Актуальные проблемы современной медицины и фармации – 2016: сборник материалов 70-й Международной научно-практической конференции студентов и молодых учёных. – Минск: БГМУ. – 2016. – С. 1113-1118.

2. Adrover, M Prion fibrillization is mediated by a native structural element that comprises helices H2 and H3 / M. Adrover, K. Pauwels, S. Prigent [et al.] // J Biol Chem. – 2010. Vol. 285. – P. 21004-21012.

3. Watts, J.C. β -Amyloid prions and the pathobiology of Alzheimer's disease / J. C. Watts, S. B. Prusiner // Cold Spring Harb. Perspect. Med. – 2017. – pii: a023507.

4. Khrustalev, V.V. The part of a long beta hairpin from the scrapie form of the human prion protein is reconstructed in the synthetic СС36 protein / V. V. Khrustalev, T. A. Khrustaleva, K. Szpotkowski, V. V. Poboinev, K. Y. Kahanouskaya // Proteins: Structure, Function, Bioinformation. – 2016. – Vol. 84. – P. 1462 – 1479.