

**Капитулец С. П.**

*Белорусский государственный медицинский университет,  
г. Минск, Беларусь*

**Капитулец Н. Н.**

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,  
г. Минск, Беларусь*

**Казак Н. Ф.**

*Белорусский государственный медицинский университет,  
г. Минск, Беларусь*

## **«ГОРЯЧИЕ ТОЧКИ» АГРЕГАЦИИ В ПОЛИПЕПТИДАХ ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ АМИЛОИДОЗАХ**

Интерес к феномену белковой агрегации в амилоидные структуры при различных патологических состояниях переместился с позиций в целом игнорируемой проблемы в статус приоритетной как для биологической, так и для медицинской науки и практики [1].

Известно, что внутри- и межклеточное накопление нерастворимых белковых агрегатов, преимущественно в нейронах и сосудах головного мозга, четко коррелирует с развитием таких тяжелых и до сих пор неизлечимых синдромов как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона, Пика, сенильная деменция, множественный склероз, боковой амиотрофический склероз, прионные болезни и др. (всего около 60 нозоформ). Белковая агрегация также является причиной резкого снижения эффективности выхода биоактивных полипептидов при биотехнологическом производстве, уменьшает срок годности и повышает токсигенность белок-содержащих лекарственных средств (гормоны, интерфероны, сыворотки, вакцины). В этом плане преодоление феномена агрегации белковых молекул *in vivo* является весьма актуальным.

В последнее десятилетие накапливаются доказательства, что в основе процесса белковой агрегации лежат общие и простые принципы, по крайней мере, это справедливо для белков с полностью ( $\beta$ -амилоидный пептид, амилин,  $\alpha$ -синуклеин и др.) или частично развернутой полипептидной цепью ( $\beta$ 2-микроглобулин, лизозим, транстиретин, прион-протеины и др.) [2, 3]. При этом склонность белка к агрегации четко определяется составляющей его последовательностью аминокислот. Более того, установлено, что только очень короткие аминокислотные отрезки полипептида, известные как «горячие точки» агрегации, определяют его агрегационные свойства. Их присутствие описано уже для большинства пептидов и белков, лежащих в основе нейродегенеративных болезней и системных амилоидозов [4]. Очевидно, что расшифровка этого механизма даст возможность управлять или, по крайней мере, минимизировать процессы нежелательной агрегации белков через проведение специфической терапии, направленной на блокирование патологических областей полипептида.

**Целью** работы было идентифицировать наличие «горячих точек» агрегации у физиологически развернутых  $\beta$ -амилоидных пептидов (A $\beta$ 40 и A $\beta$ 42), являющихся

критическими в патогенезе болезни Альцгеймера, и 12 нативно глобулярных прион-протеинов млекопитающих и птиц (PrP человека, мыши, хомяка, кролика, норки, овцы, оленя, лося, быка, кошачьих, экзотических антилоп и курицы), протеазоустойчивая изоформа которых считается коррелятом инфекционности при губкообразных энцефалопатиях, и сравнить полученные результаты с экспериментальными данными, доступными в литературе.

**Материалы и методы.** В работе использованы результаты экспериментов по агрегационной способности каждой из 20 нативных аминокислот, ранее полученные репортерным методом *in vivo* [5]. Постулируется, что индивидуальные внутренние агрегационные свойства индивидуальных аминокислот применимы к развернутой аминокислотной последовательности всех полипептидов. Аминокислотные последовательности исследуемых полипептидов были получены из электронной базы SwissProt database. Агрегационные профили белков рассчитывали путем присваивания соответствующих числовых значений каждому индивидуальному аминокислотному остатку (а.о.) в полипептидной цепи (табл.).

Полипептидную цепь сканировали скользящей рамкой из 5, 7, 9 и 11 а.о с шагом через 1 а.о. Средние значения агрегационной активности аминокислот в скользящей рамке приписывались центральной аминокислоте. Крайним N- и C-терминальным аминокислотам определяли значения, рассчитанные для первых центральных аминокислот в скользящей рамке. «Горячие точки» агрегации были идентифицированы с помощью web-программы AGGRESCAN (<http://bioinf.uab.es/aggrescan>) как области, содержащие, по крайней мере, не менее 5 а.о. в длину (минимальный размер, установленный до настоящего времени, который необходим для пептида, чтобы сформировать амилоидную фибриллу аналогичную таковой, образованной полным полипептидом [6], у которых агрегационные свойства являются выше средней агрегационной способности всей аминокислотной последовательности). Среднюю способность белка к агрегации, или пороговое значение «горячей точки» агрегации, вычисляли как сумму агрегационных свойств индивидуальных аминокислот, деленную на общее количество аминокислотных остатков в цепи.

Агрегационные свойства аминокислот (по S. Santini et al., 2004)

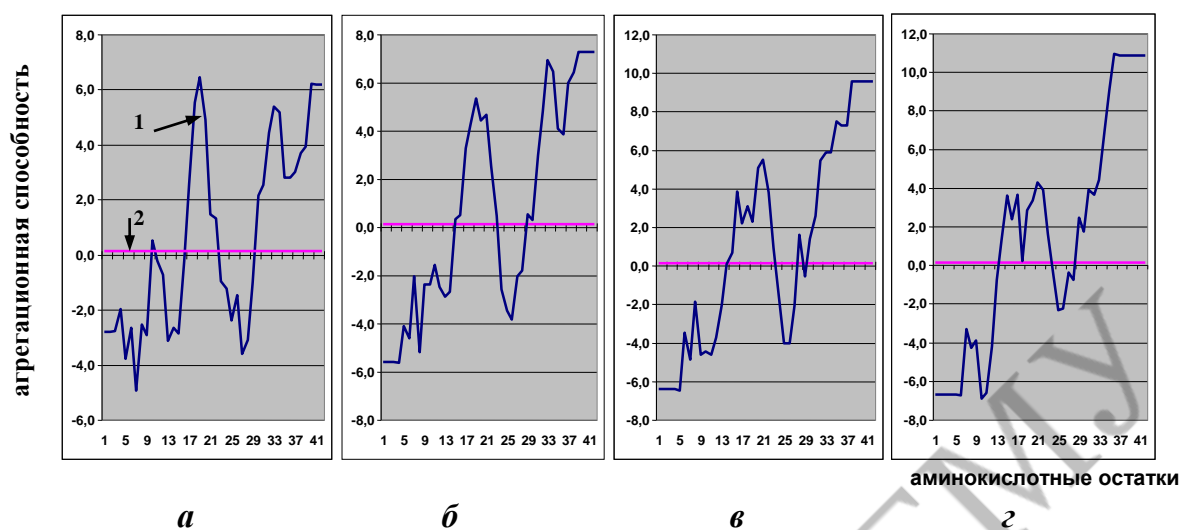
Название аминокислоты		Свойства аминокислот	Показатель агрегационной активности
русское	английское		
Изолейцин	Isoleucine (I)	нейтральная, неполярная	1,822
Фенилаланин	Phenylalanine (F)	нейтральная, неполярная	1,754
Валин	Valine (V)	нейтральная, неполярная	1,594
Лейцин	Leucine (L)	нейтральная, неполярная	1,380
Тирозин	Tyrosine (Y)	нейтральная, полярная	1,159
Триптофан	Tryptophan (W)	нейтральная, неполярная	1,037
Метионин	Methionine (M)	нейтральная, неполярная	0,910
Цистеин	Cysteine (C)	нейтральная, полярная	0,604
Аланин	Alanine (A)	нейтральная, неполярная	-0,036
Треонин	Threonine (T)	нейтральная, полярная	-0,159

Серин	Serine (S)	нейтральная, полярная	-0,294
Пролин	Proline (P)	нейтральная, неполярная	-0,334
Глицин	Glycin (G)	нейтральная, неполярная	-0,535
Лизин	before L (K)	основная	-0,931
Гистидин	Histidin (H)	основная	-1,033
Глутамин	Q-tamine (Q)	нейтральная, полярная	-1,231
Аргинин	aRginin (R)	основная	-1,240
Аспарагин	asparagiNe (N)	нейтральная, полярная	-1,302
Глутаминовая кислота	gluEtamic acid (E)	кислая	-1,412
Аспарагиновая кислота	asparDic acid (D)	кислая	-1,836

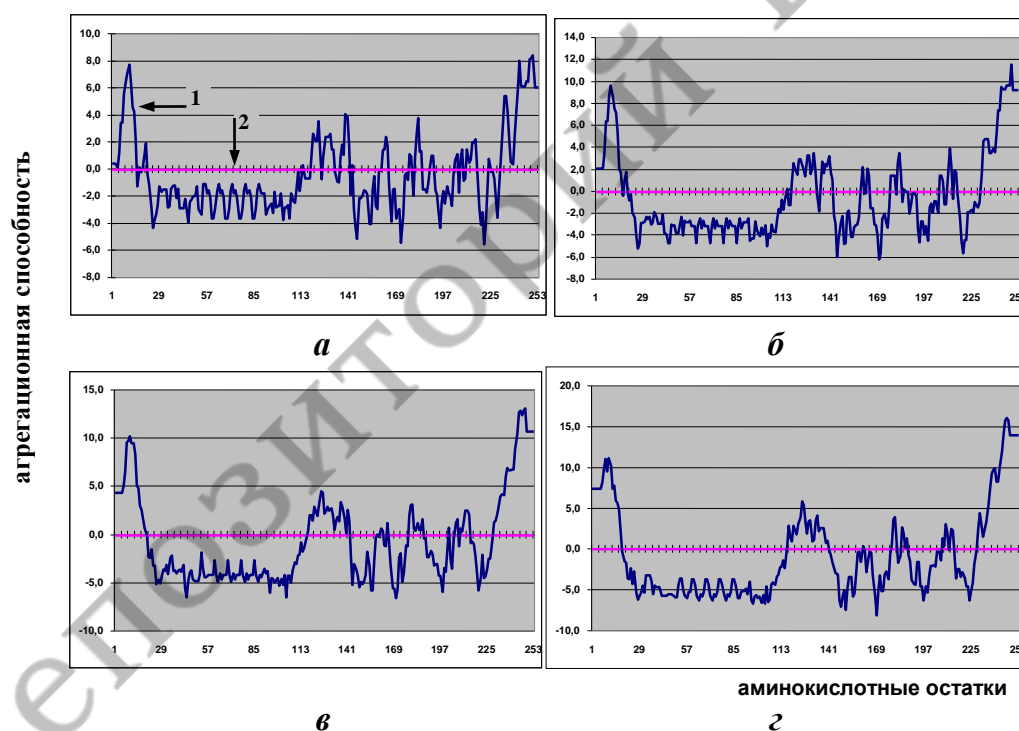
**Результаты и обсуждение.** Анализ агрегационной активности нативных аминокислот показал, что наивысшей способностью к агрегации обладают изолейцин, фенилаланин, валин и лейцин, тогда как полярные аминокислоты (аспарагин, аргинин, гистидин), аспарагиновая и глутаминовая кислоты проявляют самую низкую активность и промотируют их растворимость (табл.), что в целом согласуется с общими представлениями, что гидрофобные взаимодействия играют важную определяющую роль в белковой агрегации. Пролин лимитирует активность «горячей точки». В целом, именно гидрофобные аминокислоты имеют тенденцию вызывать агрегацию, тогда как полярные промотируют их растворимость, что в целом согласуется с общими представлениями, что гидрофобные взаимодействия играют важную определяющую роль в белковой агрегации [7].

Анализ аминокислотных последовательностей белков с использованием четырех скользящих рамок, содержащих 5, 7, 9 и 11 а.о., показал, что для последовательностей полипептидов, содержащих до 75 аминокислот, наилучшие результаты сканирования достигаются при использовании скользящей рамки длиной 5 а.о., для белков длиной  $\leq 175$  аминокислот — 7 а.о., для белков  $\leq 300$  аминокислот — 9 а.о. и для больших белков, содержащих  $> 300$  аминокислот, — 11 а.о. соответственно. Применение длинных рамок к относительно коротким последовательностям A $\beta$ 40 и A $\beta$ 42 приводит к чрезмерному сглаживанию агрегационного профиля, при этом на графике различные «горячие точки» группируются вместе, маскируются и не могут быть разграничены при анализе. Применение коротких рамок к длинным последовательностям (например, от 253 а.о. у человека до 264 а.о. у быка и 273 а.о. у курицы) вызывает появление ряда коротких графически малозначимых «горячих точек», характеризующихся низкими показателями агрегационной активности.

Рассчитанные агрегационные профили A $\beta$ 42 и PrP<sup>C</sup> человека показаны на рис. 1 и 2.



*Рис. 1.* Агрегационный профиль  $\beta$ -амилоидного белка А $\beta$ 42:  
1 — агрегационная активность центральных аминокислот в скользящей рамке; 2 — пороговое значение «горячей точки» агрегации;  
а–г — скользящая рамка, содержащая 5, 7, 9 и 11 аминокислот соответственно



*Рис. 2.* Агрегационный профиль прион-протеина PrP<sup>C</sup> человека:  
1 — агрегационная активность центральных аминокислот в скользящей рамке; 2 — пороговое значение «горячей точки» агрегации;  
а–г — скользящая рамка, содержащая 5, 7, 9 и 11 аминокислот соответственно

Следует подчеркнуть, что концепция «горячей точки» агрегации допускает, что вклад индивидуального аминокислотного остатка в последовательности белка на общую агрегацию белка так или иначе модулируется его непосредственным окружением. Согласно этому, влияние аминокислот на агрегацию белка не может быть должным образом вычислено простым сложением индивидуальных агрегаци-

онных активностей аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Чтобы обеспечить более достоверное описание влияния аминокислот на общую агрегационную способность «горячей точки», были рассчитаны индивидуальные профили агрегации для 14 белков и идентифицированы различия между областями выше соответствующих профилей средней агрегационной способности полипептидов. Области «горячих точек» в каждом профиле были нормализованы числом остатков в рассматриваемых белках с использованием web-программы AGGRESKAN.

Результаты сканирования некоторых аминокислотных последовательностей прион-протеина PrP<sup>C</sup> человека и млекопитающих представлены на рис. 3.

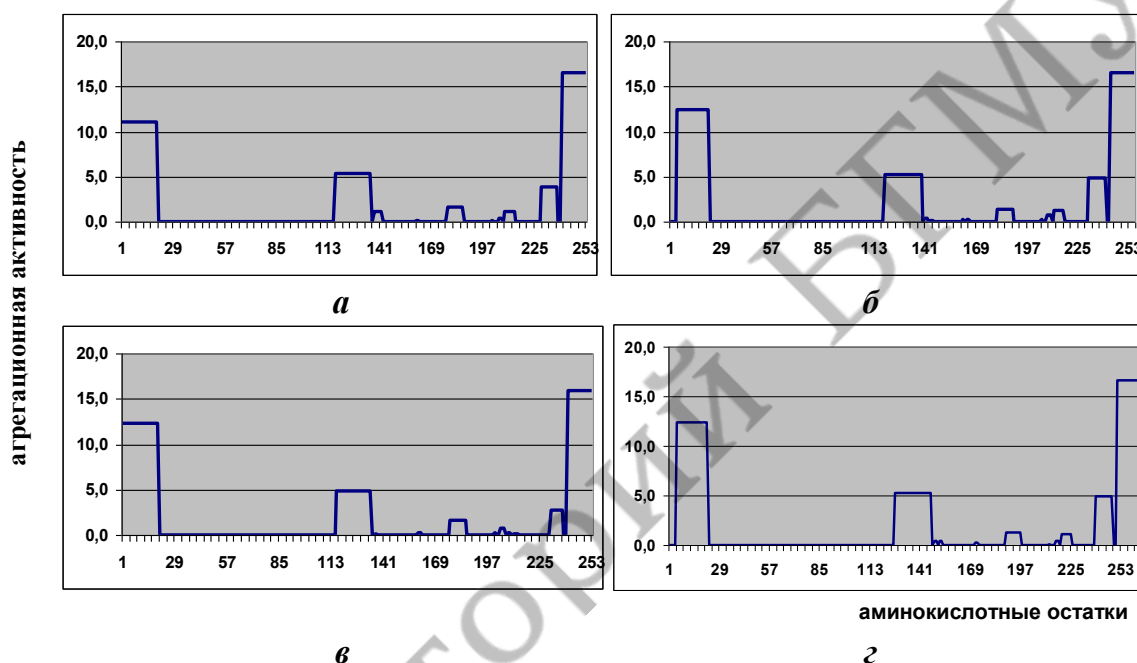


Рис. 3. «Горячие точки» агрегации прион-протеина PrP<sup>C</sup>:  
а — PrP<sup>C</sup> человека; б — PrP<sup>C</sup> барана; в — PrP<sup>C</sup> сирийского хомяка; г — PrP<sup>C</sup> быка

Полученные результаты были оценены в сравнении с доступными для анализа экспериментальными данными относительно: 1) областей, известных как промотирующие агрегацию и фибриллизацию; 2) фрагментов, агрегирующих *in vivo* (чаще после протеолиза); 3) синтетических коротких (усеченных) пептидов, для которых показана агрегация *in vitro* [8].

#### Выводы:

1. Подход, используемый в настоящей работе, представляется полезным инструментом для идентификации специфических областей аминокислотной последовательности («горячих точек» агрегации) у функционально развернутых и нативно глобулярных белков, обладающих агрегационной активностью *in vivo*.

2. Полученные результаты согласуются с гипотезой, что «горячие точки» действуют как точки нуклеации для формирования упорядоченных фибриллярных структур при патогенезе церебральных амилоидозов.

3. Выявленные «горячие точки» агрегации амилоидных белков представляют собой потенциальные мишени для блокирования развития нейродегенеративных процессов, сопровождающихся отложением амилоида в нервной ткани.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Smith, A.* Protein misfolding / A. Smith // Nature. 2003. Vol. 426. P. 883–883.
2. *Uversky, V. N.* Conformational constraints for amyloid fibrillation : the importance of being unfolded / V. N. Uversky, A. L. Fink // Biochim. Biophys. Acta. 2004. Vol. 1698. P. 131–153.
3. *A comparative study of the relationship between protein structure and beta-aggregation in globular and intrinsically disordered proteins* / R. Linding [et al.] // J. Mol. Biol. 2004. Vol. 342. P. 345–353.
4. *Rochet, J. C.* Amyloid fibrillogenesis: themes and variations / J. C. Rochet, P. T. Jr. Lansbury // Curr. Opin. Struct. Biol. 2000. Vol. 10. P. 60–68.
5. *Pathway complexity of Alzheimer's beta-amyloid Abeta16-22 peptide assembly* / S. Santini [et al.] // Structure. 2004. Vol. 12. P. 1245–1255.
6. *A comparative study of amyloid fibril formation by residues 15–19 of the human calcitonin hormone: a single beta-sheet model with a small hydrophobic core* / N. Haspel [et al.] // J. Mol. Biol. 2005. Vol. 345. P. 1213–1227.
7. *Fink, A. L.* Protein aggregation : folding aggregates, inclusion bodies and amyloid / A. L. Fink // Fold. Des. 1998. Vol. 3. P. 9–23.
8. «Горячие точки» агрегации в амилоидных белках при нейродегенеративных болезнях / С. П. Капитулец [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. Электрон. дан. (6,4 Мб). Минск : РНМБ, 2012. Вып. 5. С. 206–215.

Репозиторий БНМУ