

СВЯЗЫВАНИЕ ИОНОВ МАРГАНЦА (II) ПЕПТИДОМ SF23 В ПРИСУТСТВИИ ХЛОРИД-ИОНОВ

Хрусталёва Т.А., Хрусталёв В.В.*

ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», г. Минск

**УО «Белорусский государственный медицинский университет»*

кафедра общей химии

Актуальность

Белки существенно отличаются друг от друга по способности связывать различные катионы и анионы. На различных белках можно обнаружить как специфические сайты связывания для определенных катионов или анионов, так и неспецифические. Специфические для данного вида ионов сайты связывания и прилегающие к ним области отличаются особенностями аминокислотного состава и вторичной структуры. Например, вокруг аминокислотных остатков, участвующих в координации ионов марганца (II), достоверно снижено содержание остатков лизина, по направлению к N-концу от координирующих Mn^{2+} аминокислот часто располагается бета-тяж (5). Непосредственно с этими катионами чаще всего взаимодействуют гистидин, аспарагиновая и глютаминовая кислоты (3, 4).

В данной работе был использован химически синтезированный пептид под названием SF23, представляющий собой фрагмент дифтерийного токсина из двадцати трёх аминокислотных остатков. Его аминокислотная последовательность (Рисунок 1) соответствует наименее мутабельному эпитопу (2), антитела к которому должны препятствовать взаимодействию дифтерийного токсина с клеточным рецептором (1). В полном размере белке данный эпитоп представляет собой бета-шпильку, которая с высокой долей вероятности должна образовываться и пептидом (1).

Согласно трехмерной структуре 1F0L из Protein Data Bank (www.pdb.org) остатки аспарагиновой кислоты и гистидина (Рисунок 1) расположены в петле между двумя антипараллельными бета-тяжами. Вторичная структура вокруг двух возможных «связывателей» ионов Mn^{2+} должна способствовать его координации, однако, в непосредственной близости от них расположены три остатка лизина (обозначены красным цветом на Рисунке 1). Ионы Mn^{2+} не должны координироваться в таком положительно заряженном микроокружении (5). С другой стороны, на процесс их связывания могут оказывать влияние анионы Cl^- , сайт связывания которых, согласно 3D структуре 1F0L, включает два остатка лизина, вошедших в состав синтетического пептида (Рисунок 1). Теоретически, ионы Cl^- могут связываться с пептидом, а ионы Mn^{2+} – с уже связанными ионами Cl^- . Обратная ситуация характерна для инсулина (3D структура 2R34) – с инсулином связывается Mn^{2+} , а с ним – анион Cl^- (6).

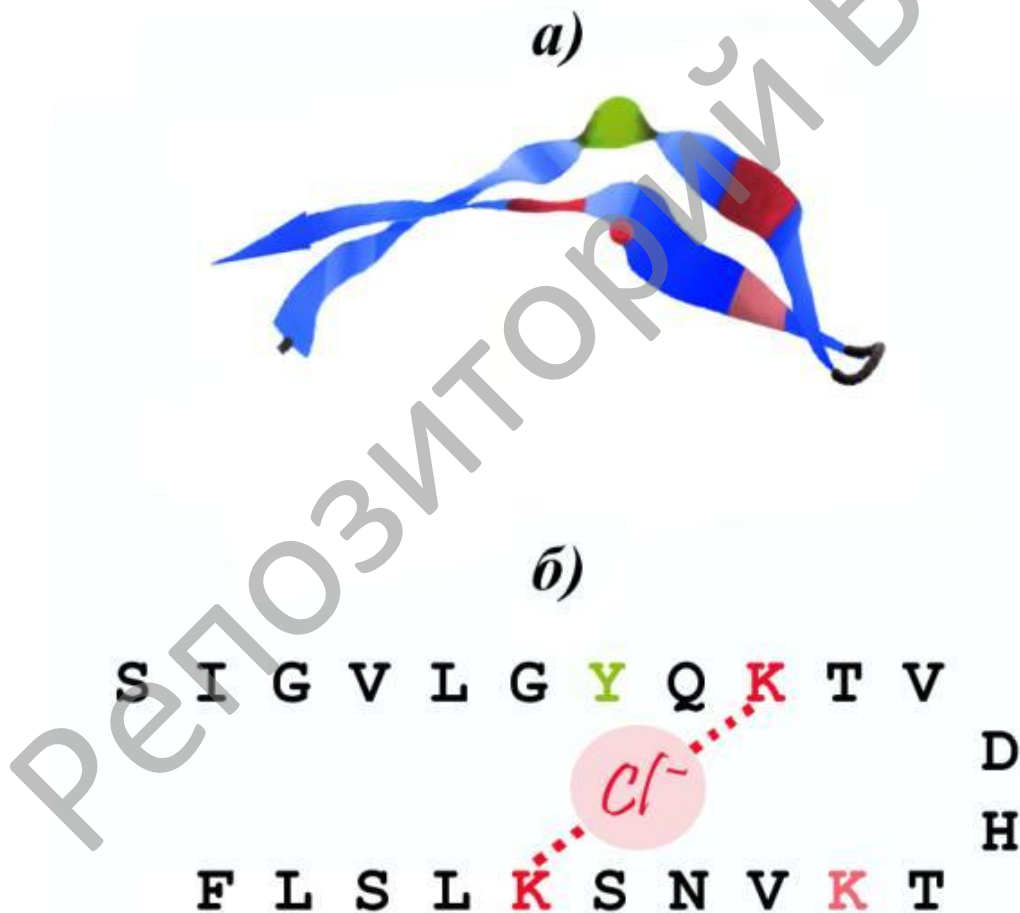


Рисунок 1 – Третичная структура фрагмента дифтерийного токсина (а), соответствующего синтетическому пептиду SF23, со связанным ионом Cl^- ; аминокислотная последовательность пептида SF23 (б)

В пептиде SF23 есть единственный остаток тирозина (обозначен зелёным цветом на Рисунке 1), который является своеобразной естественной флюоресцентной меткой. Ионы марганца (II) способны снижать интенсивность флюоресценции тирозина (тушить флюоресценцию), в том случае, если они располагаются в непосредственной близости от него (7). По этой причине представляется возможным установить факт связывания Mn^{2+} пептидом SF23 с помощью метода избирательного тушения флюоресценции.

Целью исследования явилось установление механизма связывания ионов Mn^{2+} пептидом SF23.

Материал и методы исследования

В качестве материала были использованы: синтетический пептид SF23; соли $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, CsCl, KI, KCl, K_2SO_4 . Синтез пептида был осуществлен на автоматическом синтезаторе «Symphony» (Protein Technologies, Inc., США). Контроль качества осуществлялся с помощью масс-спектрометрии (Shimadzu LCMS-2010, Япония) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (Agilent 1200, США). Молярная масса пептида соответствовала теоретически рассчитанной (2535 г/моль), степень очистки – 95,44%.

Флюоресценцию SF23 в 0,1М фосфатном буфере pH=7,4 с 0,15М NaCl (Thermo Scientific, США) тушили 1М растворами CsCl и KI в том же буфере. Флюоресценцию SF23 в 0,1М трис-HCl буфере (Thermo Scientific, США) тушили 1М растворами CsCl, KI, $MnCl_2$ и $MnSO_4$. Эксперименты по влиянию разведения на интенсивность флюоресценции раствора SF23 проводили в 0,1М трис-HCl буфере (титровали буфером, 1М раствором KCl и 0,5М K_2SO_4).

Измерение относительной интенсивности флюоресценции производили с помощью спектрофлюориметра Hitachi 650-60 (Япония). Длина волны возбуждения флюоресценции – 270 нм, длина волны регистрации – 305 нм.

Результаты и обсуждение

Известно, что бета-структурные пептиды склонны к образованию агрегатов в растворах. В таких агрегатах могут образовываться межмолекулярные водородные связи. Интересно отметить, что образование водородной связи –ОН группой тирозина значительно снижает интенсивность его флюоресценции (7). Таким образом, флюоресценция некоторой части остатков тирозина из SF23 может быть оттушена в результате образования агрегатов. Как видно на Рисунке 2, по мере разведения раствора SF23 интенсивность флюоресценции тирозина не снижается прямо пропорционально

разведению, а возрастает вплоть до разбавления раствора в 1,15 раз. Только после этого «возгорания» интенсивность флюоресценции начинает постепенно убывать, причём, под меньшим углом наклона, чем у линии ожидаемого разведения. Это свидетельствует о том, что добавление растворителя способствует разрушению какой-то части агрегатов – флюоресценция остатков тирозина перестаёт оттушиваться.

При добавлении растворов KCl и K₂SO₄, не содержащих ионов, способных непосредственно оттушивать флюоресценцию, эффект «возгорания» наблюдается только в результате внесения относительно больших объёмов. Действительно, ионы K⁺, Cl⁻ и SO₄²⁻ вступают в конкуренцию с пептидом за сольватные оболочки. Поэтому при внесении растворов солей в небольших объёмах агрегаты SF23 практически не разрушаются. Для дальнейших экспериментов были использованы лишь относительно низкие объёмы вносимых растворов солей (до 300 мкл). При этом эффект усиления флюоресценции за счёт разрушения агрегатов должен быть минимальным.

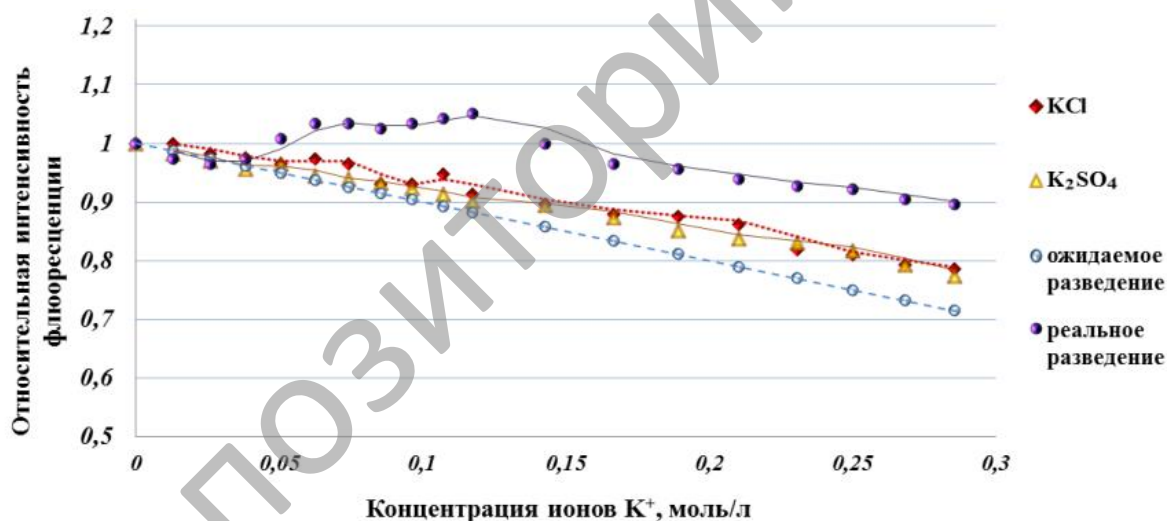


Рисунок 2 – Влияние разведения на интенсивность флюоресценции раствора пептида SF23

Раствор CsCl в *фосфатном буфере* не оттушивает флюоресценцию остатка тирозина SF23 (Рисунок 3). Это свидетельствует о том, что катионный тушитель флюоресценции – ион Cs⁺ – не взаимодействует непосредственно с

аминокислотными остатками SF23. Остатки лизина должны препятствовать как связыванию Cs^+ , так и соударениям этого иона с остатком тирозина.

Раствор CsCl в *трис- HCl буфере* снижает интенсивность флюоресценции SF23 на 7% относительно ожидаемого разведения (в концентрации 0,085 моль/л). Почему же результаты эксперимента в трис- HCl буфере существенно отличаются от таковых в фосфатном буфере? По всей видимости, анионы Cl^- , присутствующие в трис- HCl буфере, успевают связаться с пептидом SF23 ещё в процессе растворения: ионы Cs^+ начинают взаимодействовать с уже сформировавшимися комплексами пептида с хлорид-ионами. В результате формирования такого комплекса ($\text{SF23} - \text{Cl}^- - \text{Cs}^+$) катионный тушитель оказывается в непосредственной близости от остатка тирозина. Интересно отметить, что прямая, проведенная через последние три точки на кривой титрования SF23 раствором CsCl в трис- HCl буфере, параллельна линии ожидаемого разведения. Такой «излом» на кривой титрования характерен для процесса статического, а не динамического тушения флюоресценции (7).

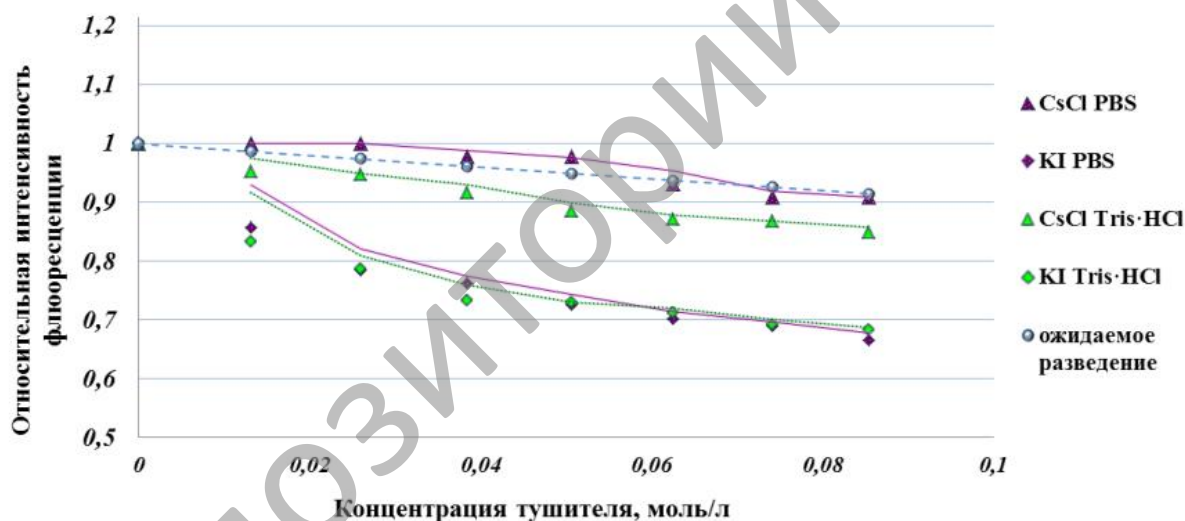


Рисунок 3 – Кривые титрования раствора пептида SF23 1М растворами CsCl и KI в 0,1М фосфатном и трис- HCl буферах

В состав 0,1М фосфатного буфера с физиологическим уровнем pH (7,4) входит NaCl в физиологической концентрации (0,15М). Концентрация хлорид-ионов в 0,1М трис- HCl буфере составляет 0,004М. Концентрация пептида в растворе составляет 0,00001М. Почему же хлорид-ионы не связывались с SF23 в растворе с их большей концентрацией? По всей видимости, ионы H_2PO_4^- и

НРО42- из фосфатного буфера также способны связываться с обогащёнными остатками лизина областью SF23, препятствуя связыванию с ней ионов Cl⁻. Ионы Cs⁺, судя по полученным нами данным, не способны к связыванию с комплексами гидро- и дигидрофосфатов с пептидом SF23.

Раствор KI оттушивает флюоресценцию SF23 на ~25% относительно ожидаемого разведения (в концентрации 0,085 моль/л) вне зависимости от того, в каком буфере проводился эксперимент (Рисунок 3). Кривые титрования SF23 раствором KI в трис-HCl и фосфатном буфере практически полностью повторяют друг друга: насыщение происходит после внесения всего 80 мкл раствора тушителя. Ионы I⁻, по-видимому, занимают сайт связывания Cl⁻ и оказываются в непосредственной близости от остатка тирозина.

Осуществление эксперимента по тушению флюоресценции ионами Mn²⁺ в фосфатном буфере не представляется возможным: образуется нерастворимый фосфат марганца (II). По этой причине на Рисунке 4 представлены результаты тушения флюоресценции SF23 исключительно в трис-HCl буфере. Вне зависимости от аниона (Cl⁻ или SO₄²⁻) катионы марганца (II) оттушивают флюоресценцию SF23 на ~14% относительно ожидаемого разведения (в концентрации 0,085 моль/л). То есть, катионы Mn²⁺ тушат флюоресценцию лучше, чем катионы Cs⁺, но слабее, чем анионы I⁻. Вероятно, Mn²⁺ образует более устойчивые связи с комплексом SF23 – Cl⁻, чем Cs⁺. Действительно, Mn²⁺ должен легче образовывать координационные связи, чем Cs⁺.

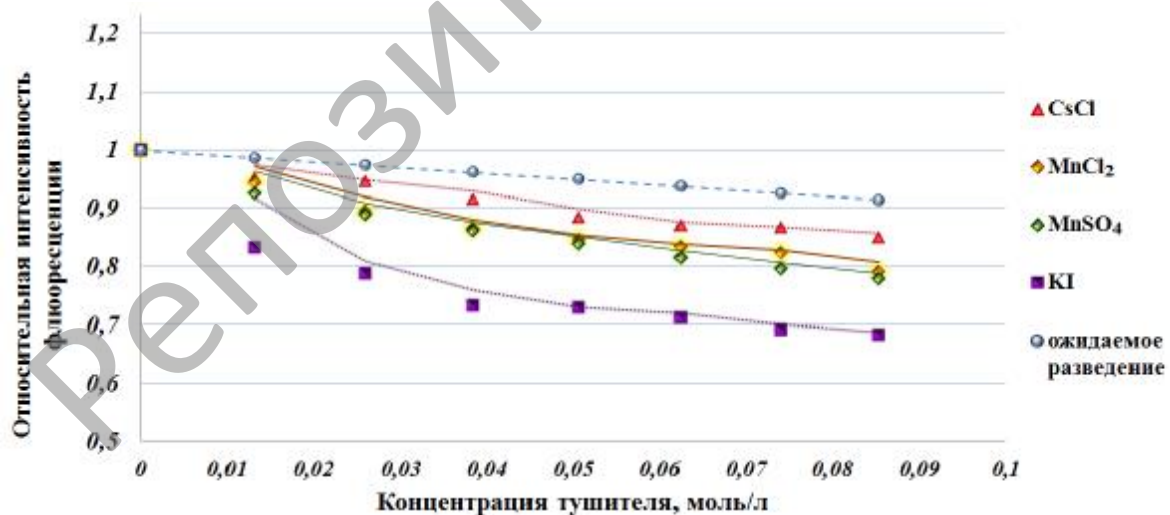


Рисунок 3 – Кривые титрования раствора пептида SF23 1М растворами CsCl, KI, MnCl₂ и MnSO₄ в 0,1М трис-HCl буфере

Отсутствие значительных отличий между кривыми титрования SF23 растворами $MnCl_2$ $MnSO_4$ можно объяснить тем, что хлорид-ионы, необходимые для связывания Mn^{2+} , были связаны с SF23 ещё в исходном растворе.

В данной работе описан пример неспецифического связывания катионов металлов комплексом пептида и хлорид-иона. Наличие такого сайта связывания определенного катиона (в данном случае – Mn^{2+}) невозможно предсказать с помощью вероятностных шкал.

Сведения о способности пептида SF23, являющегося потенциальным вакцинным антигеном, к связыванию катионов металлов в присутствии аниона Cl^- , важны для разработки соответствующего вакцинного препарата. Сам факт наличия сайта связывания ионов хлора, описанного для полноразмерного дифтерийного токсина, на коротком пептиде SF23 является свидетельством воспроизведения структуры эпитопа.

Выводы

Катионы Cs^+ не взаимодействуют непосредственно с пептидом SF23 в фосфатном буфере.

Катионы Cs^+ и Mn^{2+} образуют связи с SF23 с помощью хлорид-ионов, которые непосредственно взаимодействуют с этим пептидом.

Список литературы

1. Хрусталёв В. В. Вероятность воспроизведения вторичной структуры наиболее антигенных областей дифтерийного токсина в составе коротких пептидов / В. В. Хрусталев, Е. В. Барковский, В. Л. Колодкина // *Здравоохранение*. – 2012. – №10 – стр. 9-12.
2. A method for estimation of immunogenic determinants mutability: case studies of HIV1 gp120 and diphtheria toxin / V. V. Khrustalev (et al.) // *Journal of Integrated OMICS*. – 2011. – Vol.1. – P. 236-252.
3. Brylinski M. FINDSITE-metal: Integrating evolutionary information and machine learning for structure-based metal binding site prediction at the proteome level / M. Brylinski, J. Skolnick // *Proteins*. – 2011. – Vol. 79. – P. 735–751.
4. Data mining of metal ion environments present in protein structures / H. Zheng (et al.) // *J. Inorg. Biochem.* – 2008. – Vol. 102. – P. 1765–1776.

5. Khrustaleva T. A. Structural context around amino acid residues binding Mn²⁺ ions in bacterial proteins / T. A. Khrustaleva, V. V. Khrustalev, E. V. Barkovsky // 6. Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'13): Proceedings. – 2013. – <http://mccmb.belozersky.msu.ru/2013/abstracts/abstracts/124.pdf>.
6. Sreekanth R. Metal induced structural changes observed in hexameric insulin / R. Sreekanth, V. Pattabhi, S. S. Rajan // Int. J. Biol. Macromol. – 2009. – Vol.44. – P. 29-36.
7. Topics in fluorescence spectroscopy: Biochemical applications / J. R. Lakowicz (et al.) // Kluwer Academic Publishers. – 2002.

РЕПОЗИТОРИЙ БГМУ