

ЭНКЕФАЛИНОВЫЕ МОТИВЫ В ПРОТЕОМЕ ЧЕЛОВЕКА**Хрусталёв В.В., Скоробогатый М.В., Деменчук Е.А.***Белорусский государственный медицинский университет,
кафедра общей химии, г. Минск***Ключевые слова:** энкефалин; протеом; протеолиз; опиоидный рецептор

Резюме. В работе найдены все белки протеома человека, содержащие энкефалиновые мотивы. Установлено, что вырезание лей-энкефалина из пяти белков, не являющихся предшественниками гормонов, но содержащих соответствующую аминокислотную последовательность, невозможно с помощью специфических протеаз.

Актуальность. Энкефалины – это пентапептиды, являющиеся агонистами дельта- и мю-опиоидных рецепторов – эндогенные анальгетики и антидепрессанты. Вырабатываются эти эндогенные аналоги морфина в определённых типах нейронов путём протеолиза: крупные белки-предшественники разрезаются гистоспецифическими протеазами (прогормон-конвертазами) [1]. Существуют два типа энкефалинов: мет-энкефалин и лей-энкефалин. Аминокислотные последовательности двух типов энкефалинов отличаются друг от друга последней аминокислотой (соответственно, в мет-энкефалине последним будет метионин, а в лей-энкефалине – лейцин).

Из проэнкефалина вырезаются четыре мет-энкефалиновых пептида, два удлинённых мет-энкефалиновых пептида и один лей-энкефалиновый пептид [1]. Проопиомеланокортин содержит в себе материал для формирования десяти различных продуктов с гормональной активностью, включая одну копию мет-энкефалина. Однако считается, что мет-энкефалин из проопиомеланокортина не вырезается, а остаётся в составе более длинного эндорфина [1]. Из продинорфина вырезаются три копии лей-энкефалина и более крупные опиоидные пептиды (динорфины) [1]. В упомянутых белках перед энкефалиновыми пентапептидами находятся два остатка положительно заряженных аминокислот (аргинина или лизина). Именно такой сигнал распознают гистоспецифические прогормон-конвертазы [2].

Поскольку протеом человека полностью расшифрован, представляет определённый интерес поиск других белков, содержащих энкефалиновые мотивы, с помощью методов биоинформатики. Не менее интересен и вопрос о том, подвергаются ли отрицательному отбору белки, в которых случайным образом образуются энкефалиновые мотивы.

Целью работы явилось сравнение реальной частоты встречаемости энкефалиновых пентапептидов в протеоме человека с их теоретической частотой встречаемости.

Задачи исследования включали: 1) определение частот использования аминокислотных остатков в протеоме человека; 2) расчёт теоретической вероятности встречаемости энкефалиновых пентапептидов в протеоме человека; 3) вычисление реальной частоты встречаемости энкефалиновых пентапептидов в протеоме человека.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужила база данных человека KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), содержащая сведения об аминокислотных последовательностях всех белков человека (39209 аминокислотных последовательностей), включающих в сумме 64675431 аминокислотный остаток. Такая выборка является генеральной совокупностью.

Для поиска мотивов в белках из базы данных KEGG использовался алгоритм «MOTIF SEARCH» (<http://www.genome.jp/tools/motif/MOTIF2.html>). Ожидаемая частота встречаемости каждого мотива рассчитывалась как произведение частот встречаемости всех аминокислот, образующих данный мотив. Реальная частота использования мотива рассчитывалась как отношение количества мотивов в протеоме к общей длине протеома. При перерасчёте на белок все мотивы, находящиеся в одном и том же белке, принимались за один.

Результаты и их обсуждение.

Носителями мотива «Y-G-G-F-M» являются только два белка человека (проопиомеланокортин и проэнкефалин), в последнем из которых этот мотив повторён шесть раз. Носителями мотива «Y-G-G-F-L» являются семь белков. Среди этих белков есть те, из которых действительно вырезаются энкефалины: продинорфин (содержит три копии мотива) и проэнкефалин. Помимо них энкефалиновый мотив содержат ещё пять белков: ольфактомедин-подобный белок 3, циклин G-ассоциированная киназа, дипептидил пептидаза 9, ДНК лигаза 1 и субъединица 2 коаптомера.

Из перечисленных выше белков, содержащих лей-энкефалиновый мотив, только один может быть потенциальной мишенью для специфического вырезания лей-энкефалина после одной нуклеотидной мутации. Замена G на C способна вызывать появление мотива «Arg-Arg» перед лей-энкефалиновым пентапептидом в ДНК лигазе 1. В консенсусной последовательности там имеется мотив «Gly-Arg». ДНК лигаза 1 экспрессируется во всех типах клеток, включая нейроны, так как участвует в репарации генетического материала. В остальных носителях лей-энкефалинового мотива аргинин и лизин не находятся в двух позициях к N-концу от пентапептида. Теоретически, энкефалиновые пентапептиды могут вырезаться и неспецифическими пептидазами.

Частоты встречаемости аминокислотных остатков среди всех белков человека приведены на Рисунке 1. Следует отметить, что эта картина отличается крайней неравномерностью: к часто используемым аминокислотам можно отнести лейцин, серин, глутаминовую кислоту, аланин, глицин и пролин; к наиболее редко используемым – цистеин, метионин и триптофан. Частично эта картина является результатом эволюции каждого отдельного белка под воздействием естественного отбора и мутационного давления, частично – результатом дупликации генов, кодирующих белки с повторяющимися мотивами. Последним фактором можно отчасти объяснить высокие частоты использования серина и пролина в протеоме.

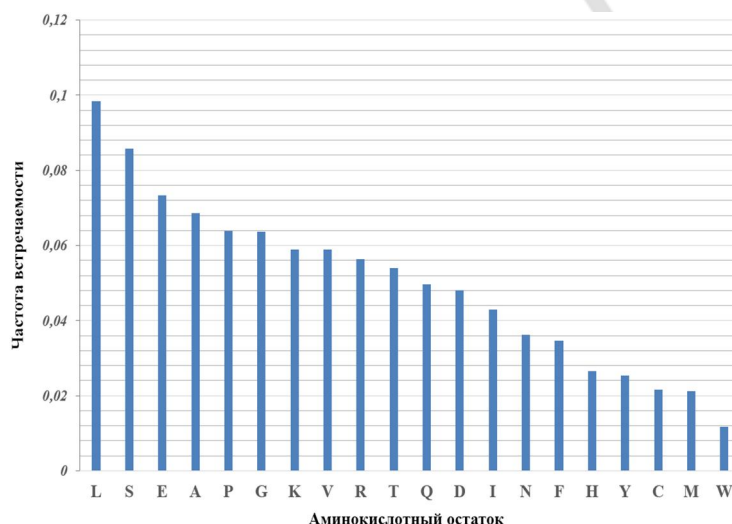


Рис. 1 – Частоты встречаемости аминокислотных остатков в протеоме человека

Интересующие нас в данном исследовании аминокислоты, входящие в состав энкефалиновых пентапептидов, имеют следующие частоты встречаемости: Leu – 0,09840; Gly – 0,06371; Phe – 0,034738; Tyr – 0,025425; Met – 0,021198. Согласно теории вероятностей, эти частоты встречаемости необходимо перемножить друг на друга, чтобы получить вероятность того, что пять аминокислотных остатков будут расположены друг за другом (образуют один пентапептид). Вероятность такого события для мет-энкефалинового мотива – $7,6076 \cdot 10^{-8}$, а для лей-энкефалинового она в 4,64 раза выше – $3,5313 \cdot 10^{-7}$. Действительно, лейцин встречается в 4,64 раза чаще, чем метионин.

Если сравнить реальную частоту встречаемости мет-энкефалинового мотива ($1,0823 \cdot 10^{-7}$) с теоретической вероятностью случайного образования такого мотива ($7,6076 \cdot 10^{-8}$), то получится, что появление такого мотива – не случайность. Однако следует учесть тот факт, что данный мотив имеет шесть копий в одном и том же белке (проэнкефалине). Тогда в перерасчёте на белок реальная частота встречаемости мотива будет в два раза ниже ожидаемой ($3,0924 \cdot 10^{-8}$). По этим данным можно заключить, что увеличение числа копий мет-энкефалинового мотива в белке проэнкефалине – результат положительного естественного отбора, а отсутствие такого мотива в других белках (кроме проэнкефалина и проопиомеланокортина) – результат отрицательного отбора.

Ситуация с лей-энкефалиновым мотивом не столь драматична, так как он встречается в некоторых белках, в норме не вовлеченных в синтез энкефалинов. Тем не менее, анализ показывает, что частота встречаемости лей-энкефалинового пентапептида ($1,3916 \cdot 10^{-7}$) ниже ожидаемой ($3,5313 \cdot 10^{-7}$), особенно в перерасчёте на белок ($1,0823 \cdot 10^{-7}$). Получается, что естественный отбор в большинстве случаев препятствует фиксации лей-энкефалиновых мотивов в белках.

Можно было бы предположить, что отрицательный отбор направлен на элиминацию возможности получения энкефалинов из большого количества белков. Однако эту гипотезу придётся отвергнуть по результатам сравнения частот использования именно энкефалиновых пентапептидов с другими пентапептидами, содержащими те же самые аминокислотные остатки, но в других комбинациях.

Всего существует 60 возможных комбинаций, в которых могут находиться пять аминокислотных остатков, два из которых (остатки глицина) повторяются.

Как видно на Рисунке 2, все пентапептиды, содержащие Tyr, два Gly, Phe и Met (кроме, собственно, мет-энкефалинового), отличаются более низкой частотой встречаемости, чем ожидается по частотам использования четырёх аминокислотных остатков, входящих в них. При перерасчёте на белок все мотивы, включая мет-энкефалиновый, оказываются недораспределёнными.

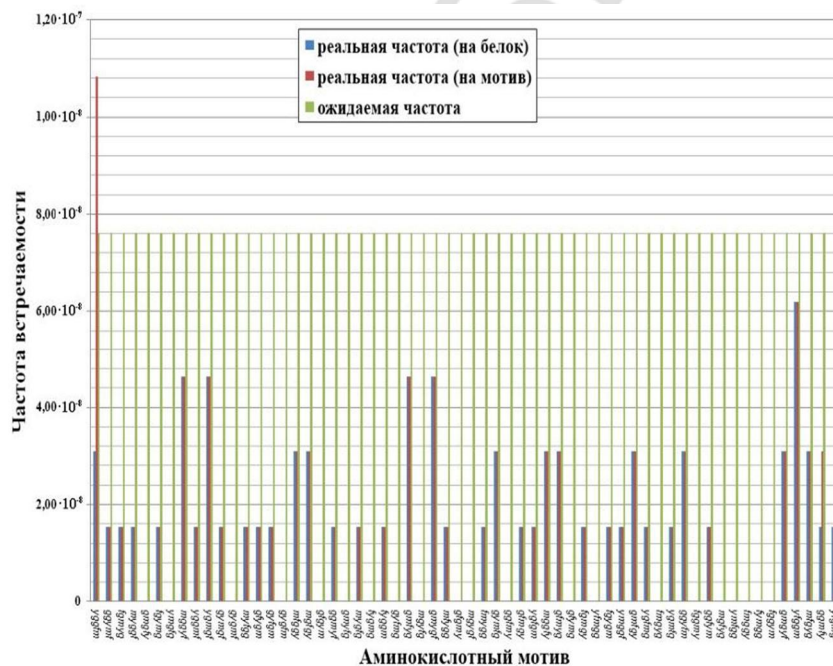


Рис. 2 – Частоты использования мет-энкефалинового мотива и мотивов, содержащих те же аминокислотные остатки в других комбинациях, в протеоме человека

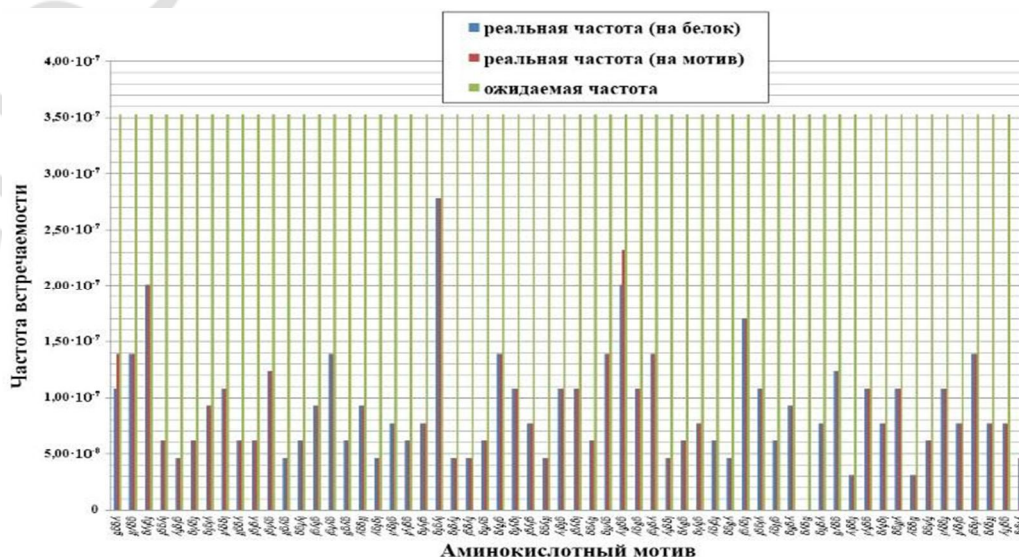


Рис. 3 – Частоты использования лей-энкефалинового мотива и мотивов, содержащих те же аминокислотные остатки в других комбинациях, в протеоме человека

На Рисунке 3 видно, что все возможные мотивы, состоящие из Tyr, двух Gly, Phe и Leu, имеют меньшую частоту встречаемости, чем ожидается. Получается, что естественный отбор направлен на снижение частоты использования не только и не

столько энкефалиновых мотивов, сколько пентапептидов, в которых находятся упомянутые выше аминокислотные остатки, расположенные в любом порядке.

Следует отметить, что все аминокислоты из энкефалиновых мотивов обладают гидрофобными боковыми цепями. Глицин вообще лишён боковой цепи. Располагаясь друг за другом, эти аминокислоты создают гидрофобный кластер в полипептидной цепи. Такие гидрофобные кластеры склонны к образованию бета-тяжей [3]. Появление в белке нового фрагмента, формирующего бета-структуру, может привести к межмолекулярной агрегации (как в случае с прионным белком и мутантными версиями энкефалиновых пептидов [3]) и возникновению амилоидоза. Подобные летальные последствия случайных мутаций должны элиминироваться отрицательным отбором. Видимо, по этой причине в белках относительно редко встречаются кластеры, состоящие только из гидрофобных аминокислотных остатков.

Выводы:

1. Лей-энкефалиновый мотив, в отличие от мет-энкефалинового, встречается в пяти белках, в норме не вовлечённых в синтез энкефалинов.

2. Мет-энкефалиновый мотив встречается в протеоме человека более часто, чем ожидается, за счёт наличия шести копий этого мотива в проэнкефалине.

3. Частоты встречаемости белков, содержащих как мет-, так и лей-энкефалиновый мотив, снижены по сравнению с ожидаемыми, что связано с отрицательным отбором, направленным на сокращение частоты встречаемости гидрофобных кластеров в белках, а не непосредственно энкефалиновых мотивов.

Литература

1. Costa E., Mocchetti I., Supattapone S., Snyder S.H. Opioid peptide biosynthesis: enzymatic selectivity and regulatory mechanisms // *FASEB Journal*. – 1987. – Vol. 1. – P.16-21.

2. Cawley N.X., Wetsel W.C., Murthy S.R., Park J.J., Pacak K., Loh Y.P. New roles of carboxypeptidase E in endocrine and neural function and cancer // *Endocrine Reviews*. - 2012. – Vol. 33. - P. 216-253.

3. Do T.D., LaPointe N.E., Sangwan S., Teplow D.B., Feinstein S.C., Sawaya M.R., Eisenberg D.S., Bowers M.T. Factors that drive peptide assembly from native to amyloid structures: experimental and theoretical analysis of [leu-5]-enkephalin mutants // *Journal of Physical Chemistry Part B*. – 2014. – Vol.118. – P.7247-7256.