

ДОКИНГ ПЕПТИДОВ С БОЛЬШИМ ПРИОННЫМ БЕЛКОМ ЧЕЛОВЕКА

¹Побойнев В.В., ¹Хрусталёв В.В., ²Хрусталёва Т.А., ¹Барковский Е.В.

¹Белорусский государственный медицинский университет, кафедра общей химии,
г. Минск

²Институт физиологии НАН Беларуси, лаборатория клеточных технологий,
г. Минск

Ключевые слова: пептид, большой прионный белок человека, докинг, бета-тяж, альфа-спираль.

Резюме. В данной статье описаны наиболее вероятные области связывания коротких аутогенных пептидов с большим прионным белком человека, определены аминокислотные остатки, за счёт которых происходит связывание в молекулярном докинге.

Resume. Most probable regions of short autogenic peptides binding by major human prion protein are described in this paper. Amino acid residues taking part in interactions in docking experiments are identified.

Актуальность. Механизмы образования бета-амилоида при прионных заболеваниях до сих пор экспериментально не установлены: известно лишь то, что переход нормального прионного белка (PrPC) в патологический (PrPSc) сопровождается резким ростом содержания в нём бета-структуры и агрегацией. Согласно гетеродимерной модели, преимущественно бета-структурное состояние возникает у мономерного белка PrP и физическое взаимодействие PrPSc с PrPC катализирует превращение PrPC → PrPSc [1]. При этом постулируется, что спонтанный переход PrPC → PrPSc маловероятен из-за высокого энергетического барьера. Следовательно, переходу преимущественно альфа-спирального мономерного прионного белка в преимущественно бета-структурный должны способствовать специфические факторы, такие как взаимодействие с ионами металлов, повышение температуры, окислительный стресс. Наличие определённых мутаций в прионном белке должно снижать энергетический барьер для такого перехода [2]. После осуществления перехода PrPC → PrPSc из гетеродимера образуются гомодимеры PrPSc/PrPSc, которые могут диссоциировать, запуская новые этапы конформационного превращения в составе димеров, или агрегировать с другими гомодимерами, образуя отложения амилоида [1]. Наличие агрегированной формы белка не обязательно для прионного перехода и рассматривается как вторичное явление, не связанное с конформационной перестройкой как таковой.

Альтернативный механизм прионного перехода рассмотрен в полимеризационной модели, согласно которой прионное превращение неотделимо от агрегации, так как прионную конформацию может стабильно поддерживать только олигомер или мультимер PrPSc [1]. Стадией, лимитирующей скорость перехода PrPC → PrPSc, является образование «ядра» – олигомера PrPSc, являющегося интермедиатом прионного превращения. Полимеризационная модель

допускает существование двух возможных вариантов механизма прионного перехода. Первый вариант прионного превращения предполагает, что PrPC и PrPSc сосуществуют в термодинамическом равновесии, сдвинутом в сторону PrPC, и PrPSc образуется до присоединения мономера PrP к «ядру». Стабилизация состояния PrPSc происходит при присоединении мономера PrPSc к «ядру» PrPSc, в результате чего мономер PrPSc оказывается в составе полимера PrPSc. Если мономер PrPSc не присоединяется к «ядру» PrPSc, происходит обратное превращение PrPSc в PrPC. Вторым вариантом полимеризационной модели предполагается, что конформационная перестройка происходит в момент присоединения мономера PrPC к олигомеру PrPSc.

В обеих моделях не рассматривается возможность протеолиза PrPC и последующего связывания альфа-спиральных прионных белков с короткими пептидами, соответствующими структурно неустойчивым областям этого белка. Можно предположить, что пептиды, соответствующие наиболее структурно неустойчивым областям прионного белка согласно вероятностным методам предсказания вторичной структуры (вторая альфа-спираль и N-конец третьей альфа-спирали [2]), могут взаимодействовать с PrPC и снижать энергетический барьер для его перехода в PrPSc. При этом альфа-спирали должны располагаться в составе комплекса таким образом, чтобы облегчался переход от взаимодействующих альфа-спиралей к межмолекулярной бета-структуре: или параллельно, или антипараллельно. Протестировать эту гипотезу можно с помощью программы hex dock 8.0 [3] для молекулярного докинга белков.

Цель: оценить возможность образования комплексов прионного белка человека и пептидов, соответствующих его второй и N-концу третьей альфа-спирали, способствующих структурному переходу от взаимодействующих альфа-спиралей к межмолекулярной бета-структуре.

Задачи:

1. Получить модели пептидов, соответствующих второй и третьей альфа-спирали большого прионного белка человека;
2. Провести докинг моделей коротких пептидов к полноразмерному прионному белку.

Материал и методы. В данной работе в качестве рецептора использована третичная структура большого прионного белка человека. Идентификатор этого белка в Protein Data Bank – 1HJM (www.pdb.org). В качестве лигандов использованы модели пептидов, соответствующие второй и N-концу третьей альфа-спирали большого прионного белка человека, а также сам полноразмерный белок.

С помощью сервера Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) [3] были получены 3D-модели коротких пептидов, соответствующих второй (аминокислотные остатки 179-193) и N-концу третьей (200-214) альфа-спирали большого прионного белка человека. Затем был проведён докинг вышеуказанных пептидов к большому прионному белку человека. Для проведения докинга использовался алгоритм hex dock 8.0 (<http://hexserver.loria.fr/>) [4]. Для определения

аминокислот, за счёт которых происходит образование комплекса белок-пептид, использовался алгоритм Protein Interactions Calculator (<http://pic.mbu.iisc.ernet.in/>) [5].

Результаты и их обсуждение.

Алгоритм hex dock 8.0 определил сто наиболее вероятных моделей связывания пептида 179-193 с большим прионным белком человека. В результате анализа полученных моделей было выяснено, что первая альфа-спираль никогда не участвует в связывании пептида в параллельном или антипараллельном положении (рис. 1а). Вторая и третья альфа-спирали, как правило, образуют с пептидом 179-193 комплексы в положении «крест-накрест». В четырёх из ста наиболее вероятных комплексов вторая альфа-спираль находится в антипараллельном положении с пептидом, в одном – в параллельном. Такие структуры, однако, могли бы образовываться и в экспериментах с пептидом, соответствующим второй альфа-спирали [6]. По данным исследователей, проводивших эти эксперименты, пептид не переходил в бета-структурное состояние ни при нагревании, ни при взаимодействии с катионами различных металлов [6]. Следовательно, возможное образование комплексов между пептидом 179-193 и второй альфа-спиралью полноразмерного белка не должно приводить к альфа-бета переходу.

Возможен (в трёх из ста моделей) и вариант образования комплекса, в котором пептид находится в антипараллельном положении с третьей альфа-спиралью (рис. 1б). Такой комплекс стабилизирован водородными связями между аминокислотными остатками из С-конца пептида и N-конца второй альфа-спирали, между остатками из первой альфа-спирали и N-конца пептида. Получается, что пептид зафиксирован с двух сторон над третьей альфа-спиралью. Контакты пептида с самой третьей-альфа-спиралью немногочисленны: ионные связи остатков глутаминовой кислоты (207 и 211) с остатком лизина из пептида и водородная связь между боковыми цепями Glu211 и тем же остатком лизина. Такое взаимное расположение пептида 179-193 и прионного белка должно способствовать образованию бета-структуры между пептидом и третьей альфа-спиралью.

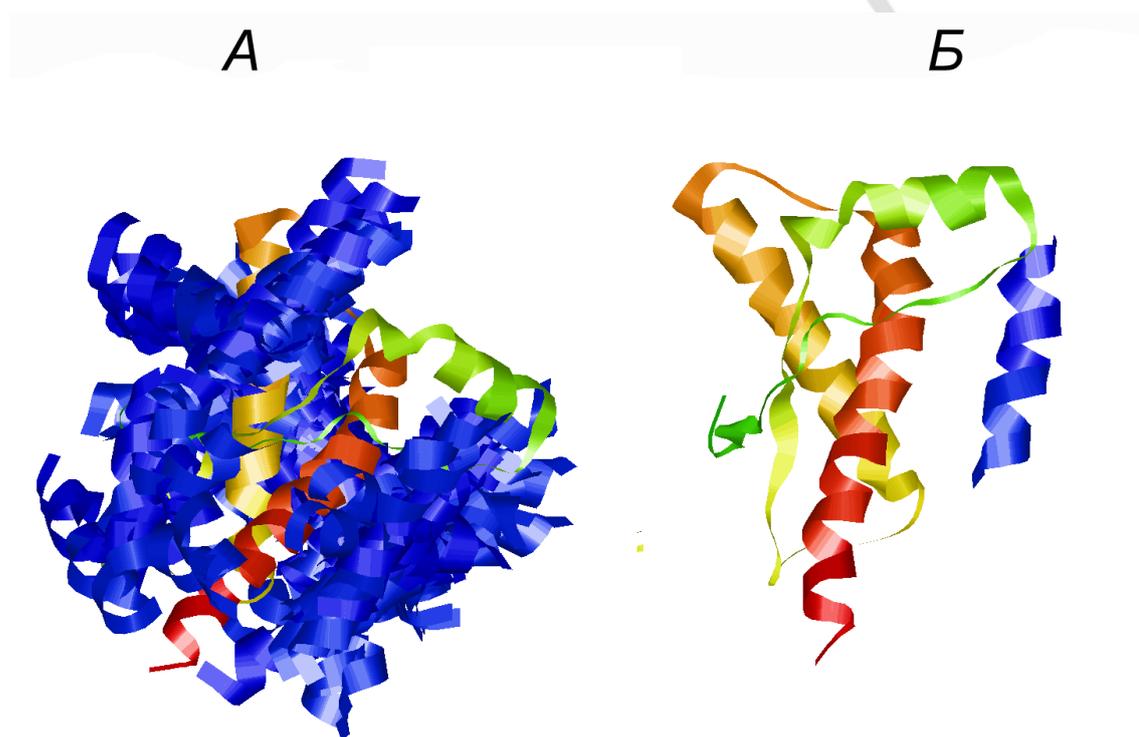


Рис. 1 – Все 100 (а) и наиболее склонная к альфа-бета переходу (б) модель взаимодействия пептида 179-193 с большим прионным белком человека. Синий цвет – пептид 179-193; зелёный – первая альфа-спираль; оранжевый – вторая альфа-спираль; красный – третья альфа-спираль

После анализа результатов докинга пептида 179-193 и большого прионного белка человека был проведён докинг пептида 200-214 с тем же белком: получены сто наиболее вероятных моделей образования комплекса. Первая альфа-спираль не участвует в связывании пептида 200-214 в параллельном или антипараллельном положении (рис. 2а). Во втором по вероятности образовании (из ста) комплексе пептид находится в антипараллельном положении со второй альфа-спиралью (рис. 2б). Такое положение поддерживается, в основном, за счёт водородных связей аминокислотных остатков пептида с аминокислотными остатками из первой альфа-спирали, расположенного вслед за ней короткого второго бета-тяжа и близлежащих неструктурированных участков. Единственным остатком из второй альфа-спирали, контактирующим с пептидом, является His187 (образует как водородные связи, так и ионные взаимодействия). Как и в случае с предыдущим пептидом последующему образованию межмолекулярной бета-структуры не мешают контакты между альфа-спиральными участниками комплекса.

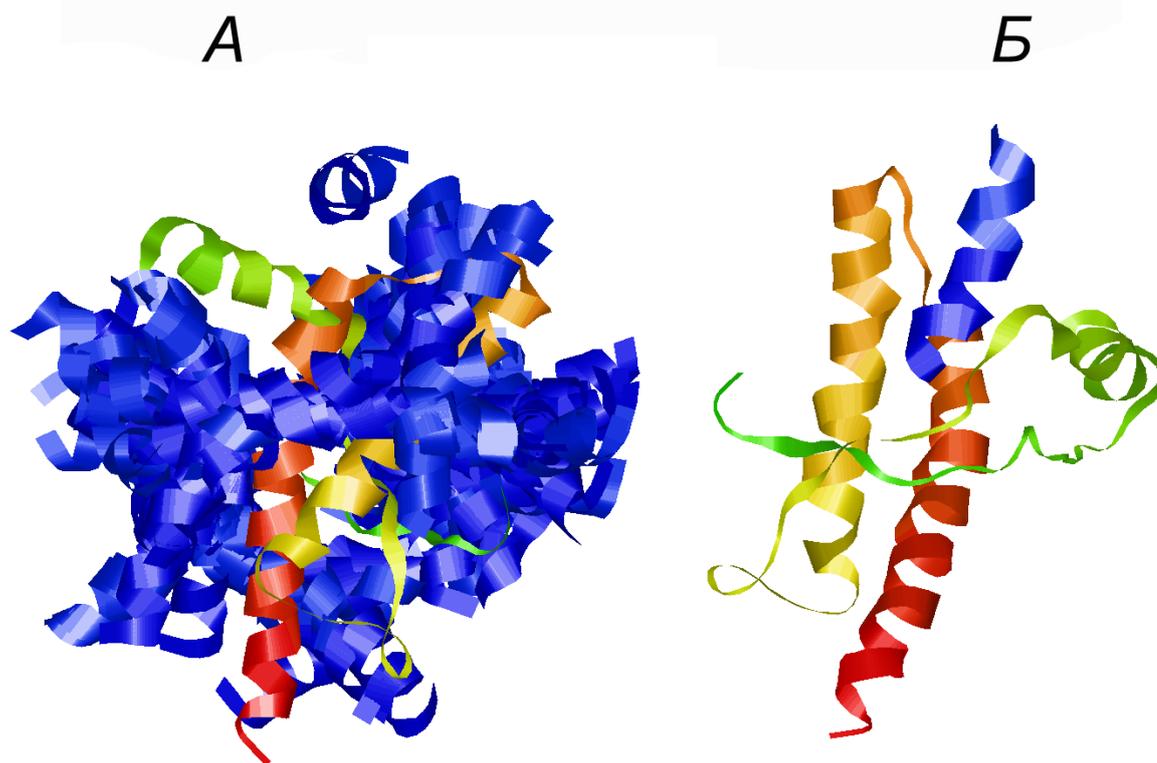


Рис. 2 – Все сто (а) и наиболее склонная к альфа-бета переходу (б) модель взаимодействия пептида 200-214 с большим прионным белком человека. Синий цвет – пептид 179-193; зелёный – первая альфа-спираль; оранжевый – вторая альфа-спираль; красный – третья альфа-спираль

Интересно отметить, что по результатам докинга полноразмерных прионных белков друг к другу димеры, в которых вторые или третьи альфа-спирали расположены параллельно или антипараллельно, полностью отсутствуют. Возможны варианты, при которых альфа-спирали образуют контакты, близкие к таковым в приведенных на Рисунках 1а и 2а моделях (в положении «крест-накрест»). Однако такие димеры не являются наиболее вероятными. Как и в кристаллографических экспериментах [7], чаще всего прионные белки контактируют за счёт коротких бета-тяжей и неструктурированных фрагментов.

Пептиды, соответствующие второй альфа-спирали, действительно существуют в альфа-спиральном состоянии [6]. Сведения о пептидах, соответствующих N-концу третьей альфа-спирали, в Protein Data Bank отсутствуют. Проведенные в настоящей работе эксперименты подтвердили, что, если в процессе протеолиза нормальной формы прионного белка могут образовываться короткие пептиды, соответствующие структурно неустойчивым (по данным вероятностных алгоритмов) альфа-спиральным фрагментам, то они (при достижении высокой концентрации) могут связываться со структурно неустойчивыми фрагментами в положениях, способствующих альфа-бета переходу.

Нельзя исключить возможность того, что вторая и третья альфа-спирали нормального прионного белка могут образовывать бета-структуру друг с другом и в мономерном белке, после структурных перестроек, ослабляющих связи между этими альфа-спиралями. К факторам, в результате которых взаимное расположение альфа-спиралей (в норме спирали расположены в положении «крест-накрест») приблизится к антипараллельному, предположительно, можно отнести нагревание, разрушение дисульфидной связи Cys179-Cys214 и координацию ионов металлов.

Выводы:

1. Как пептид, соответствующий второй альфа-спирали прионного белка (аминокислотные остатки 179-193), так и пептид, соответствующий третьей альфа-спирали (200-214), с наибольшей вероятностью образуют контакты с соответствующими областями полноразмерного белка в положении «крест-накрест».

2. Варианты, в которых короткие пептиды, соответствующие второй и N-концу третьей альфа-спирали, связываются с соответствующими структурно неустойчивыми фрагментами полноразмерного белка в антипараллельном положении, немногочисленны, но возможны.

3. Избыточное накопление продуктов протеолиза нормального прионного белка может повышать вероятность его перехода от альфа-спиральной к бета-структурной (патологической) форме.

Литература

1. Шкудина, И. С. Прионы / И. С. Шкудина, М. Д. Тер-Аванесян // Успехи биологической химии. – 2006. – Т. 46. – С. 3-42.
2. Побойнев В. В. Изменение структуры большого прионного белка человека при болезни Крейтцфельда-Якоба и фатальной семейной бессоннице / В. В. Побойнев, Е. В. Барковский, В. В. Хрусталёв // Инновации в медицине и фармации - 2013: материалы науч.-практич. конф. молодых учёных. – Минск: БГМУ, 2013. – С. 132-140.
3. Ghoorah A.W. Protein docking using case-based reasoning / A.W. Ghoorah, M. Smail-Tabbone, M.-D. Devignes, D.W. Ritchie // Proteins: Structure, Function, Bioinformatics. – 2013. – Vol. 81. – P. 2150-2158.
4. Tina K. G. PIC: Protein interactions calculator / K. G. Tina, R. Bhadra and N. Srinivasan // Nucleic Acids Research. – 2007. – Vol. 35. – P. 473-476.
5. Biasini M. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information / M. Biasini, S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T. G. Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli, T. Schwede // Nucleic Acids Research. – 2014. – Vol. 42. – P. 252-258.
6. Ronga, L. NMR structure and CD titration with metal cations of human prion alpha2-helix-related peptides / L. Ronga, P. Palladino, G. Saviano, T. Tancredi, E. Benedetti, R. Ragone, F. Rossi // Bioinorganic Chemistry Applied. – 2007. – N.10720.
7. Lee, S. Conformational diversity in prion protein variants influences intermolecular beta-sheet formation / S. Lee, L. Antony, R. Hartmann, K. J. Knaus, K. Surewicz, W. K. Surewicz, V. C.Yee // EMBO Journal. – 2010. – Vol. 29. – P. 251-262.