

*А.А. Марченко, У.Н. Буслович*  
**ПОИСК НОВЫХ ПРЕПАРАТОВ ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ ДЛЯ БОРЬБЫ  
С БОЛЕЗНЬЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА**

*Научный руководитель: д-р биол. наук, доц. В.В. Хрусталёв*  
*Кафедра общей химии*  
*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

*A.A. Marchenko, U.N. Buslovich*  
**SEARCH FOR NEW PEPTIDE DRUGS TO FIGHT ALZHEIMER'S DISEASE**

*Tutor: PhD V.V. Khrustalev*  
*Department of General Chemistry*  
*Belarusian State Medical University, Minsk*

**Резюме.** С помощью молекулярного моделирования, белок-белкового докинга и оптимизации моделей полученных комплексов найден наиболее перспективный пептид IKRIRK для блокирования сайта связывания с бета-секретазой на фрагменте белка предшественника бета-амилоидных пептидов.

**Ключевые слова:** молекулярное моделирование, болезнь Альцгеймера, протеолиз.

**Resume.** With the help of molecular modeling, protein-protein docking and refinement of obtained complexes the most promising peptide IKRIRK has been found that is able to block the binding site for beta secretase on the fragment of amyloid peptide precursor protein.

**Keywords:** molecular modeling, Alzheimer disease, proteolysis.

**Актуальность.** Болезнь Альцгеймера — наиболее распространенная форма нейродегенеративных заболеваний, которая характеризуется сначала потерей кратковременной памяти, затем прогрессирует: нарушается речь, долговременная память, когнитивные функции. По расчетам специалистов к 2050 году количество заболевших составит более 100 млн человек. Молекулярный механизм развития болезни Альцгеймера заключается в отложении агрегатов бета-амилоидных пептидов. Эти пептиды вырезаются из длинного белка-предшественника с помощью фермента бета-секретазы [1]. Если протеолиз происходит с помощью фермента альфа-секретазы, бета-амилоидные пептиды не образуются. Как известно, белок APP не является предпочтительной «мишенью» для протеолиза с помощью бета-секретазы. Вероятно, что в процессе эволюции закрепились некоторые особенности структуры белка APP в районе связывания с бета-секретазой, с одной стороны, снижающие их сродство, а с другой стороны – не приводящие к полному отсутствию возможности их взаимодействия. Одной из стратегий лечения болезни Альцгеймера может быть сдвиг равновесия в сторону протеолиза белка-предшественника альфа-секретазой.

**Цель:** настоящего этапа работы был дизайн пептида, способного связать находящийся в альфа-спиральной конформации фрагмент белка-предшественника бета-амилоидных пептидов в районе сайта протеолиза бета-секретазой.

**Задачи:**

1. Получить модели 30 олигопептидов, способных к связыванию с белком-предшественником бета-секретазы в районе протеолиза бета-секретазой.

## 2. Отобрать наиболее перспективный пептид-блокатор.

**Материалы и методы.** Трёхмерные модели 30 олигопептидов получили с помощью PerFOLD 3.5 [2]. Докинг каждого из этих пептидов проводили с моделью под названием TE12, представляющей собой фрагмент модели пептида TQ24. Для докинга использовали программу Hex 8.0.0 [3]. Модели пяти лучших комплексов оптимизировали с помощью GalaxyRefineComplex [4]. Вслед за оптимизацией проводился расчёт энергии связывания с помощью сервера Prodigy [5]. Далее для двух лучших комплексов применялся докинг с моделью бета-секретазы (PDB ID: 1XN2) снова с помощью Hex 8.0.0 [3].

**Результаты и их обсуждение.** Альфа-спиральный пептид TE12, соответствующий фрагменту белка предшественника бета-амилоидных пептидов, содержащему сайт протеолиза бета-секретазой, имеет весьма характерную аминокислотную последовательность: **TEEISEVKMDAE**. Среди 12 аминокислотных остатков 5 являются отрицательно заряженными (написаны жирным подчёркнутым шрифтом) и только 1 положительно заряженным (написан курсивом). В связи с этими особенностями белка-мишени, в качестве лигандов были использованы 30 олигопептидов длиной от 5 до 7 остатков, обогащённых положительно заряженными остатками, но содержащих и гидрофобные аминокислотные остатки. В таблице 1 приведены значения изменения свободной энергии в результате образования наиболее энергетически выгодного комплекса согласно Hex 8.0.0. Наибольшее по модулю значение изменения свободной энергии в процессе образования комплекса характерно для пептида IKRVRK.

После «исправления» комплексов наиболее выгодными оказались таковые с пептидами IKRVRK и IKRIRK. Контакты между моделями пептидов IKRVRK и TE12 формируются следующим образом: Ile1 – Ile4 (гидрофобный контакт); Lys2 – Glu3 (ионный контакт); Lys2 – Glu6 (ионный контакт и водородная связь между боковыми цепями); Arg3 – Glu3 (ионный контакт); Arg5 – Asp10 (ионный контакт); Lys6 – Glu12 (ионный контакт и водородная связь). Присутствуют и водородные связи между основной и боковой цепями: Ile1 – Glu3; Lys2 – Glu3; Arg5 – Met9; Arg5 – Asp10; Arg5 – Glu12. Не участвует во взаимодействиях с мишенью только Val4 (Рисунок 1).

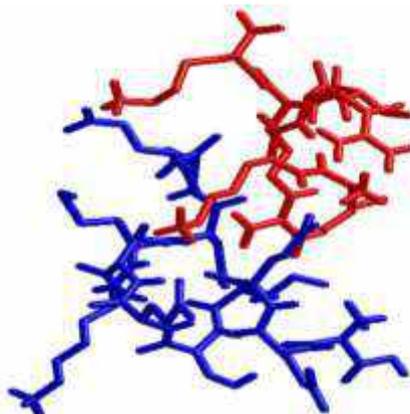
Контакты между моделями пептидов IKRIRK и TE12 формируются несколько иначе по сравнению с предыдущим комплексом: Ile1 – Ile4 (гидрофобный контакт); Lys2 – Glu6 (ионный контакт и водородная связь между боковыми цепями); Arg3 – Glu3 (ионный контакт и водородные связи между боковыми цепями); Lys6 – Glu12 (ионный контакт и водородная связь между боковыми цепями). Только Ile4 не участвует во взаимодействиях с мишенью (Рисунок 2). Получается, что в комплексе с IKRIRK по сравнению с комплексом с IKRVRK отсутствуют два ионных контакта (Lys2 – Glu3 и Arg5 – Asp10) и две водородные связи Arg5 – с Met9 и Asp10, но остаток Arg5 формирует водородную связь Ala11. При этом, согласно PRODIGY, такой комплекс не менее энергетически выгоден, чем комплекс с IKRVRK (Таблица 2).

**Табл. 1.** Энергии связывания пептидов с фрагментом TE12 белка-предшественника бета-амилоидных пептидов, содержащих сайт протеолиза бета-секретазой, согласно Hex 8.0.0.

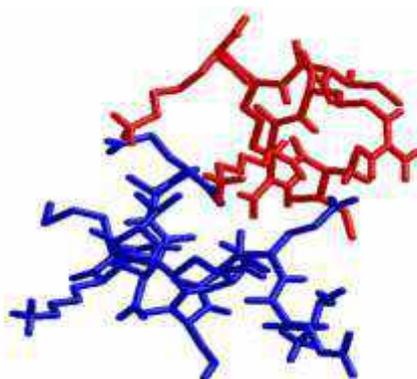
№	Пептид	Энергия связывания, кДж/моль
1	IKRVRK	-563,32
2	IKKVRK	-559,61
3	IKRIRK	-550,07
4	VKRIRK	-547,33
5	VKRAKP	-525,98
6	VKRIRR	-522,4
7	VKRIRP	-504,53
8	VKRIRW	-483,31
9	VKRIR	-477,58
10	VKRVR	-475,33
11	VKRIK	-472,97
12	VKRGRP	-472,89
13	VKKIR	-472,84
14	VKKIK	-471,79
15	VKRARPI	-470,61
16	VKRLR	-470,4
17	VPRIR	-467,38
18	VKRARP	-467,08
19	VKRAR	-466,08
20	VKRIKP	-464,89
21	VKRAK	-464,5
22	LKRIR	-460,33
23	VKRWRP	-460,25
24	VSRIR	-451,28
25	VKRIN	-446,48
26	VKRIQ	-437,59
27	ITRIR	-431
28	VGRIR	-430,6
29	VTRIR	-424,25
30	NPRIAR	-422,5

**Табл. 2.** Результаты определения свободной энергии Гиббса образования комплекса для пяти пептидов с трёхмерной моделью сайта связывания белка-предшественника бета-амилоидных пептидов с бета-секретазой согласно Prodigy.

№	Пептид	Изменение свободной энергии, кДж/моль
1	IKRVRK	-14,64
2	IKKVRK	-13,39
3	IKRIRK	-14,64
4	VKRIRK	-14,23
5	VKRAKP	-14,23

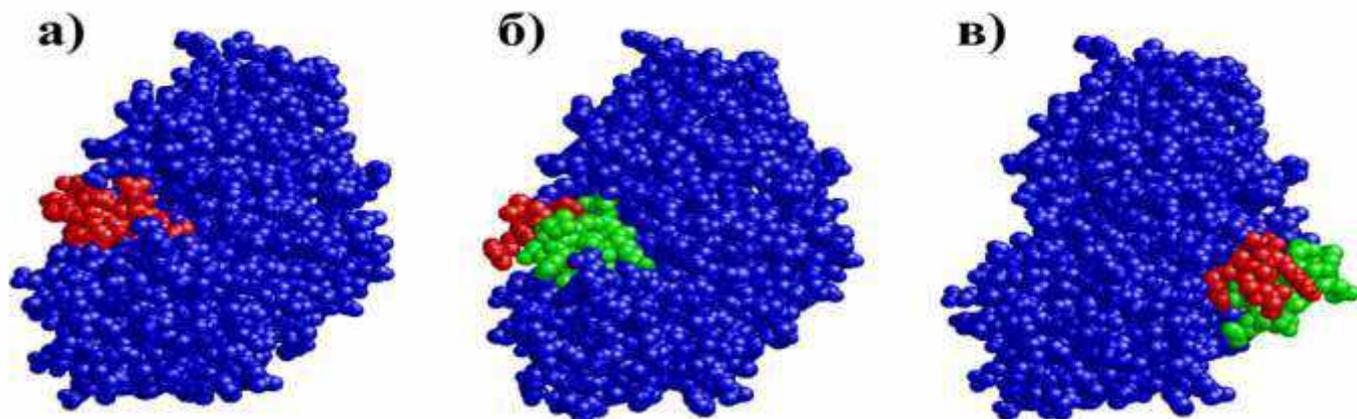


**Рис. 1** – Оптимизированная модель пептида IKRVRK (красный) с пептидом TE12 (синий)



**Рис. 2** – Оптимизированная модель комплекса пептида IKRIRK (красный) с пептидом TE12 (синий)

Следующий этап докинга был проведён для того, чтобы сделать выбор между пептидами-блокаторами IKRVRK и IKRIRK. Отдельно взятый пептид TE12 программа HEX 8.0.0 безошибочно направляет в полость бета-секретазы, с которой взаимодействует N-конец пептида на структуре её комплекса с искусственным субстратом (Рисунок 3а). Докинг комплекса пептида TE12 с пептидом IKRVRK приводит к «направлению» TE12 в ту же полость (Рисунок 3б). Докинг комплекса TE12 с пептидом IKRIRK приводит к образованию связей с обратной стороной бета-секретазы – субстрат не находится вблизи активного центра фермента (Рисунок 3в). Энергия связывания комплекса TE12/IKRIRK с бета-секретазой больше по модулю (-536,77 кДж/моль), чем энергия связывания комплекса TE12/IKRVRK вблизи её активного центра (-516,91кДж/моль).



**Рис. 3** – Результаты белок-белкового докинга: а) комплекс бета-секретазы (синий) с пептидом TE12 (красный); комплекс бета-секретазы (синий) с комплексом пептида TE12 (зелёный) с пептидом-блокатором VKRVRK (красный); комплекс бета-секретазы (синий) с комплексом пептида TE12 (зелёный) с пептидом-блокатором VKRIRK (красный).

Полученные данные заставляют сделать выбор в пользу гексапептида IKRIRK для использования его на дальнейших этапах разработки пептидного блокатора сайта связывания белка APP с бета-секретазой.

**Выводы:** с помощью молекулярного моделирования и белок-белкового докинга из 30 кандидатов выбран наиболее перспективный гексапептид IKRIRK, способный образовывать высокоаффинный комплекс с белком APP в районе сайта связывания с бета-секретазой и существенно снижать вероятность попадания данного фрагмента APP в её активный центр.

#### Литература

1. Substrate and inhibitor profile of BACE (beta-secretase) and comparison with other mammalian aspartic proteases / F. Grüninger-Leitch [et al.] // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277, iss. 7. – P. 4687–4693.
2. PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex / A. Lamiable [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2016. – Vol. 44. – P. 449-454.
3. Protein docking using case-based reasoning / A. W. Ghoorah [et al.] // Proteins. – 2013. – Vol. 81. – P. 2150-2158.
4. Heo, L. GalaxyRefineComplex: Refinement of protein-protein complex model structures driven by interface repacking / L. Heo, H. Lee, and C. Seok // Sci. Rep. – 2016. – Vol. 6. – N. 32153.
5. PRODIGY: a web-server for predicting the binding affinity in protein-protein complexes / L. Xue [et al.] // Bioinformatics. – 2016. – Vol. 32. – P. 3676 – 3678.