

СТРУКТУРНЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ПОЛИМОРФИЗМА В РАЙОНЕ САЙТА СВЯЗЫВАНИЯ БЕЛКА-ПРЕДШЕСТВЕННИКА БЕТА-АМИЛОИДНЫХ ПЕПТИДОВ С БЕТА-СЕКРЕТАЗОЙ

Хрусталёв В. В.¹, Хрусталёва Т. А.², Попинако А. В.³

¹Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

²Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

³Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Введение. Одним из ключевых этапов патогенеза болезни Альцгеймера является окислительный стресс [1]. Олигомеры бета-амилоидного пептида выступают в качестве восстановителей катионов Cu^{2+} и Fe^{3+} до Cu^+ и Fe^{2+} , причём непосредственно за счёт наличия в них трёх остатков гистидина. В качестве продукта этих реакций образуется H_2O_2 , который окисляет Cu^+ и Fe^{2+} , образуя свободный радикал $\text{OH}^\cdot$ [1]. Накопление бета-амилоидных фибрилл вызывает провоспалительную реакцию, что в свою очередь стимулирует развитие окислительного стресса. Некоторые известные полиморфные варианты белка-предшественника бета-амилоидных пептидов (APP) приводят к увеличению их продукции и секреции [1]. Соответствующие аминокислотные замены расположены в непосредственной близости от сайта связывания APP с бета-секретазой. Следует отметить, что в процесс белок-белкового взаимодействия зачастую вовлекаются фрагменты полипептидных цепей, не имеющие определённой трёхмерной структуры. Такая особенность позволяет им образовывать достаточно устойчивые комплексы за счёт структурных переходов, происходящих непосредственно в процессе связывания.

Цель. Оценка влияния аминокислотных замен, приводящих к раннему развитию болезни Альцгеймера, и, наоборот, снижающих риск её развития, на структуру сайта связывания белка APP с бета-секретазой.

Методы исследования. В качестве материала послужили последовательности фрагмента белка APP, содержащие сайт связывания с бета-секретазой: использована нативная последовательность (TEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQ) и таковые, содержащие шесть полиморфных вариантов. Структуру этих последовательностей предсказывали с помощью ab-initio методов компьютерного моделирования: PepFold 3.5 и C-QUARK. Фрагменты, способные к переходу в неструктурированное состояние (англ.: disorder), предсказывали с помощью алгоритма PentUnFOLD 2D. С помощью того же алгоритма оценили способность к переходу в неструктурированное состояние самой бета-секретазы (структура в PDB: 3ZL7).

Результаты и их обсуждение. Моделирование последствий четырёх полиморфных вариантов белка APP, при которых бета-секретазы должна образовывать более устойчивый комплекс с его фрагментом, привело к

получению противоречивых результатов. Согласно результатам PepFold 3.5, в рассматриваемом фрагменте APP формируется альфа-спираль, несмотря на наличие аминокислотных замен. Длина альфа-спирали незначительно варьирует среди пяти лучших моделей (от остатка 2 до остатка 12-16), что соответствует результатам работы PepFold 3.5 над нативной последовательностью. Результаты C-QUARK отличались значительно большим разнообразием. Для нативной структуры наиболее энергетически выгодной была конформация, включающая короткую альфа-спираль (остатки 2-7) и бета-шпильку (12-15 и 19-22). В трёх менее вероятных моделях, однако, на месте первого бета-тяжа предсказывалась вторая короткая альфа-спираль. Только пятая модель содержала одну длинную альфа-спираль. Так или иначе, в четырёх лучших моделях C-QUARK «сгибал» цепь в районе непосредственного сайта для протеолиза (между остатками M9 и D10). В этом же районе находится «изгиб» цепи и в случае наличия в ней двойной «Шведской» мутации KM670/671NL, благодаря которой бета-секретаза осуществляет протеолиз белка APP более эффективно. При этом на трёх моделях N-концевая альфа-спираль укорочена, а на двух вообще отсутствует, в отличие от альфа-спирали 11-16. Замена A673V привела к моделированию длинной альфа-спирали (2-16 или 2-13) во всех пяти лучших моделях. При заменах D678N и E682K «изогнутая» структура из двух коротких спиралей воспроизвелась в 4 из 5 лучших моделей. Ещё одна модель содержала одну длинную альфа-спираль. На двух моделях, содержащих замену D678N за второй спиралью (представленной спиралью 3/10) формировалась короткая бета-шпилька. Интересно отметить, что последствия замены E665D, которая не влияет на сродство бета-секретазы с белком APP, были практически аналогичны таковым для замены A673V: на всех пяти моделях формировалась длинная альфа-спираль. Структура исследованного фрагмента APP после внесения «Исландской» замены A673T, значительно снижающей сродство бета-секретазы с сайтом связывания, была практически такой же, как и после внесения замены E682K. Полученные данные свидетельствуют о том, что рассматриваемый фрагмент сам по себе подвержен структурным переходам: после N-концевой короткой альфа-спирали, за характерным «изгибом», может формироваться как бета-шпилька, так и вторая короткая спираль. Более того, фрагмент может «выпрямляться», формируя одну длинную альфа-спираль. Весьма вероятно, что «изгиб» полипептидной цепи APP формируется непосредственно в процессе взаимодействия бета-секретазы с субстратом.

На втором этапе исследования последствия шести перечисленных выше аминокислотных замен оценивали с помощью алгоритма PentUnFOLD 2D, как при условии существования фрагмента APP в форме короткой альфа-спирали и бета-шпилки, так и в форме одной длинной альфа-спирали. Следует отметить, что для нативной последовательности в первой конформации PentUnFOLD 2D предсказал, что четыре из пяти остатков короткой альфа-спирали склонны к переходу в неструктурированное состояние, так же как два из четырёх остатков в каждом бета-тяже и один остаток из петли между ними. Во второй конформации склонным к такому переходу фрагментом является не только

N-конец альфа-спирали (те же четыре остатка), но и её С-конец (три остатка). Наиболее значительные изменения в предсказаниях характерны для последствий «Исландской» протективной замены А673Т: в первой конформации петля между альфа-спиралью и бета-тяжом становится склонной к переходу как в бета-тяж, так и в альфа-спираль, а первый остаток этого бета-тяжа переходит в разряд абсолютно неструктурированных фрагментов цепи; во второй конформации три остатка из середины альфа-спирали становятся склонными к переходу в неструктурированное состояние. Замена А673Т внесла «хаос» в предсказания по аминокислотной шкале: на участке 7-14 для нативной последовательности предсказывалась альфа-спираль, а после замены она стала прерываться на бета-структуру в положении 9 и на петлю в положении 12, что сделало невозможным однозначное предсказание структуры в этом фрагменте. По бета-структурной шкале на участке 8-12 предсказывался бета-тяж, а после замены А673Т в положениях 9-12 предсказывается петля, а в положении 13 – альфа-спираль.

Интересно отметить, что при «Шведской мутации» фрагмент EV, находящийся на С-конце первой короткой альфа-спирали, перестаёт предсказываться как склонный к переходу в неструктурированное состояние. Нейтральная замена Е665D никак не отразилась на предсказании фрагментов, склонных к переходу в неструктурированное состояние. Замена А673V закономерно привела к появлению у петли между короткой альфа-спиралью и бета-тяжом способности к переходу в бета-структуру в первой конформации и снизила стабильность альфа-спирали во второй. Замена D678H повысила стабильность С-конца первого бета-тяжа в первой конформации и привела к исчезновению у С-конца длинной альфа-спирали способности к переходу в неструктурированное состояние – во второй. Замена Е682K привела к стабилизации С-конца второго бета-тяжа (по аминокислотной шкале).

В результате анализа трёхмерных структур бета-секретазы в комплексе с пептидами (структуры в PDB: 1XN2 и 1XN3) и оценки способности её фрагментов к переходу в неструктурированное состояние, нами сделан вывод о том, что наиболее структурно неустойчивый её участок связывает фрагмент полипептидной цепи, находящийся по направлению к С-концу от гидролизуемой связи, если субстрат сам по себе не является в значительной мере структурно неустойчивым.

Выводы. Для успешного связывания субстрата с бета-секретазой по направлению к С-концу от гидролизуемой связи должен находиться фрагмент с определённой третичной структурой. По этой причине последствием аминокислотных замен, стабилизирующих альфа-спираль (КМ670/671NL), или бета-структуру (А673V и Е682K), или же и альфа-спираль, и бета-структуру (D678H) в данном фрагменте является раннее развитие болезни Альцгеймера. Протективная «Исландская» замена А673Т, наоборот, способствует переходу рассматриваемого участка APP в неструктурированное состояние, препятствуя протеолизу и снижая риск развития болезни Альцгеймера.

КИСЛОРОД И СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ, 2022

Работа выполнена при поддержке гранта БРФФИ Б21РМ-046 (Хрусталёва Т.А.), РФФИ 20-54-04-004 и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Попинако А.В.)

ЛИТЕРАТУРА

1. Meraz-Rios M.A., Franco-Bocanegra D., Rios D.T. et al. Early onset Alzheimer's disease and oxidative stress // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2014. – Vol. 2014, № 375968. – P. 1–14.

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра нормальной физиологии

КИСЛОРОД И СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ

Сборник материалов
научно-практической конференции с международным участием

26-27 мая 2022 года

Под редакцией профессора В. В. Зинчука

Гродно
ГрГМУ
2022