

В. В. Побойнев

УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ПРИОННОГО ПЕПТИДА СС36 ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА СПЕКТРА КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА

Научный руководитель: канд. биол. наук, доц. Хрусталёв В. В.

Кафедра общей химии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

Резюме. В данной статье приведены данные о вторичной и третичной структурах синтезированного пептида СС36, соответствующего С-концу второй и N-концу третьей альфа-спирали большого прионного белка человека. Показана возможность использования пептида СС36 в качестве антигена для создания вакцины от прионных заболеваний.

Ключевые слова: синтезированный пептид, прионный белок человека, круговой дихроизм, структурный переход.

Resume. This article contains the data about the secondary and tertiary structures of the synthetic СС36 peptide corresponding to the C-terminal part of the second alpha helix and N-terminal part of the third alpha helix of the major human prion protein. The possibility of the usage of the СС36 peptide as an antigen for the creation of a vaccine against prion diseases is shown.

Keywords: synthetic peptide, human prion protein, circular dichroism, structural shift.

Актуальность. Прионные заболевания на сегодняшний день являются неизлечимыми. Также не существует никакой иммунопрофилактики от этих заболеваний. Губчатые энцефалопатии, как человека, так и животных, всегда заканчиваются летальным исходом. Точный механизм образования патологической формы большого прионного белка человека не установлен. Известно лишь то, что переход нормального прионного белка в патологический сопровождается резким ростом содержания в нём бета-структуры и агрегацией [1]. Известно несколько областей данного белка, способных образовать бета-тяжи при определённых условиях. Одним из таких районов является С-конец второй и N-конец третьей альфа-спирали [1].

Цель: установить наиболее вероятную третичную структуру прионного пептида СС36 на основании анализа спектра кругового дихроизма.

Задачи:

1. Смоделировать пептид СС36 *in silico*.
2. Получить прионный пептид СС36.
3. Установить структуру пептида.

Материал и методы. Для автоматического твёрдофазного синтеза пептида СС36 был использован синтезатор "Symphony" (Protein Technologies, Inc.). Контроль качества осуществлялся с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (Agilent 1200) и масс-спектрометрии (Shimadzu LCMS-2010). Спектр кругового дихроизма был получен с помощью спектрографа Jasco J-815. Во всех экспериментах был использован 0.01 М раствор пептида СС36 в фосфатном буфере с рН=5.3.

Анализ спектров кругового дихроизма произведён с помощью программы CAPITO (<http://capito.nmr.leibniz-flf.de>) [2]. Спектры флюоресценции были получены при помощи флюориметра "Solar CM2230". Спектры кругового дихроизма и флюоресценции были измерены при разных температурах с целью обнаружить структурный переход. Спектры кругового дихроизма получены при температурах от 5°C до 80°C при шаге в 5°C. Спектры флюоресценции получены при температурах от 28°C до 53°C при шаге в 1°C. Для предсказания вторичной структуры пептидов использовался оригинальный алгоритм "PentaFOLD.xlsx". Предсказания вторичной структуры данного алгоритма основывается на двух вероятностных шкалах: аминокислотной и пентапептидной. Для 3D моделирования пептида использовался сервер PEP-FOLD. Для построения гексамера пептида СС36 на основе полученной модели, сконструированной сервером PEP-FOLD [3], использовалась программа HEX 8.0.0 [4].

Результаты и их обсуждение. Известно, что контактирующие друг с другом вторая и третья альфа-спирали прионного белка человека считаются наиболее вероятными областями для перехода в бета-тяжи. Между данными альфа-спиралями обнаружено множество контактов, в том числе и дисульфидная связь. С помощью аминокислотной шкалы алгоритма PentaFOLD на месте второй альфа-спирали предсказано два бета-тяжа: 177-178 и 180-192 (номера аминокислотных остатков). На N-конце третьей альфа-спирали предсказаны бета-тяжи 201-205 и 207-217. С помощью пентапептидной шкалы было обнаружено, что область 175-180 предсказывается как альфа-спираль, а 181-183 как бета-тяж. Для подтверждения гипотезы, согласно которой взаимодействие второй альфа-спирали с третьей альфа-спиралью позволяет второй альфа-спирали переходить в бета-тяж, был синтезирован пептид СС36. Данный пептид начинается остатком цистеина из одной альфа-спирали (Cys179) и заканчивается остатком цистеина из другой (Cys214). В последовательность аминокислот пептида внесены 4 замены, благодаря которым стал возможным его твердофазный синтез. На C-конце пептида Val210 был заменён на Arg210, а Met206 заменён на Arg206. Замены внесены для того, чтобы избежать формирования бета-структуры во время синтеза. Phe198 заменён на Trp198 с целью введения флюорофора в пептид СС36 для расширения спектра методов, позволяющих исследовать

его структуру. На N-конце пептида Val180 заменён на Pro180 с целью повышения вероятности формирования дисульфидной связи между Cys179 и Cys214.

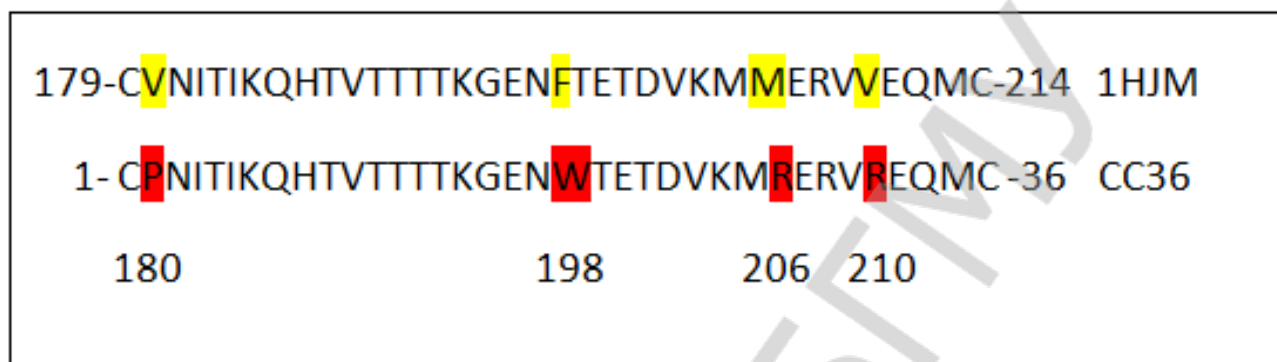


Рисунок 1 – Аминокислотная последовательность С-конца второй и N-конца третьей альфа спирали прионного белка человека (сверху) и пептида CC36 (снизу)

После обработки спектра кругового дихроизма пептида CC36 (рисунок 2), выполненной с помощью программы CAPITO, установлено, что 15% аминокислотных остатков (или 5 аминокислот) имеет альфа-спиральную конформацию, 37% – образуют бета-тяжи (или 13 аминокислот), 48% – имеют неструктурированное состояние (или 17 аминокислот).

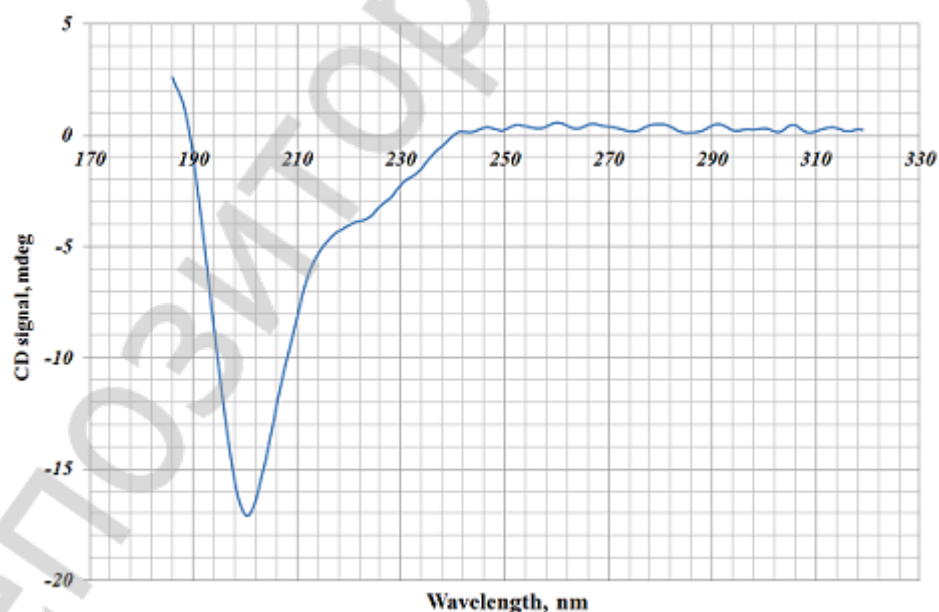


Рисунок 2 – Спектр кругового дихроизма пептида CC36

После этого с помощью сервера PEP-FOLD нами было получено более 1000 моделей пептида CC36. Из них была выбрана наиболее вероятная, имеющая на С-конце спираль 3/10, в середине – два бета-тяжа (бета-шпилька), каждый по семь аминокислот (рисунок 3). По 3D модели пептида видно, что бета-тяжи включают 14

аминокислотных остатков, а по данным КД в них содержится 13,32 аминокислот (значит в бета-тяжах должно быть или 13, или 14 аминокислот). А так как бета-тяжи в сумме, в большинстве случаев, имеют чётное количество аминокислот, то число остатков в бета-шпильке пептида скорее равно 14, а не 13.

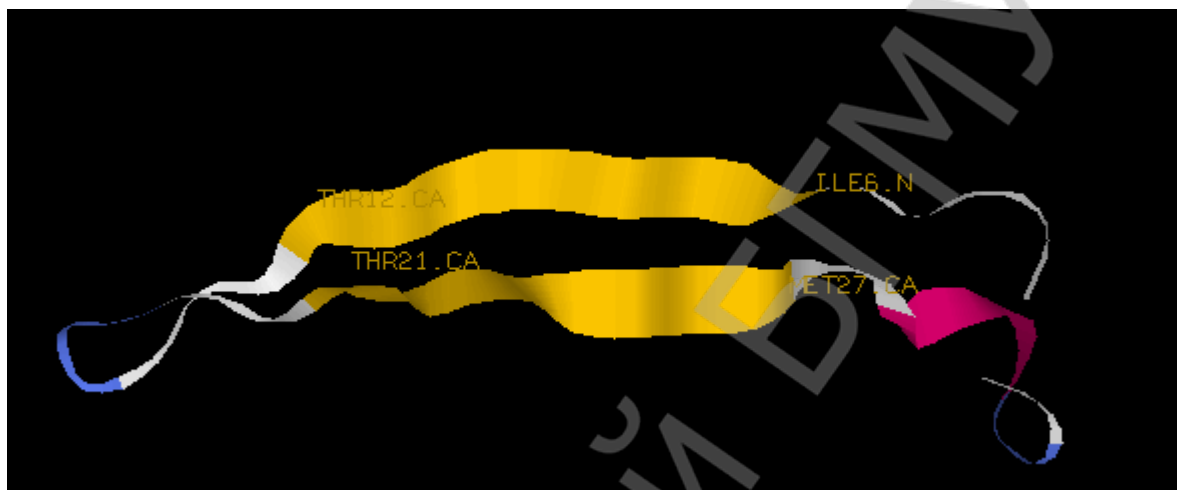


Рисунок 3 – Наиболее вероятная модель пептида СС36

Термический анализ синтезированного пептида СС36, проведенный под контролем спектров кругового дихроизма показал, что содержание различных элементов вторичной структуры остаётся неизменным в изучаемом диапазоне температур (от 5°C до 80°C). А с помощью спектров флюоресценции найден структурный переход между 31°C и 37°C (рисунок 4).

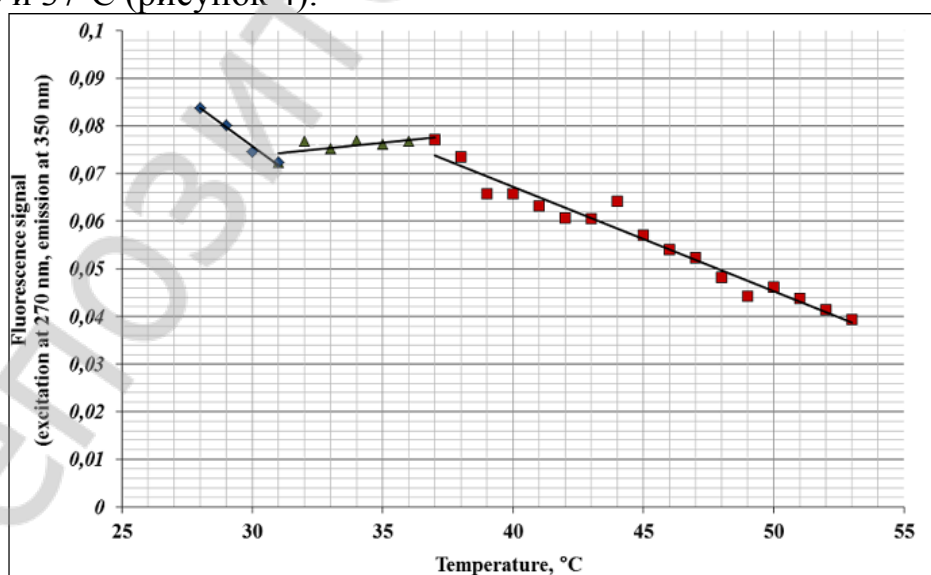


Рисунок 4 – Зависимость интенсивности флюоресценции от температуры

Данный структурный переход связан не с изменением содержания вторичной структуры в пептида (так как переходы по спектру КД отсутствуют), а с диссоциа-

цией какого-то олигомера. Чтобы доказать существование последнего и определить его молекулярную массу был проведён электрофорез в нативном геле пептида СС36 совместно с белками с известной молекулярной массой (лошадиный миоглобин и цитохром С) (рисунок 5).



Рисунок 5 – результаты электрофореза пептида СС36, миоглобина и цитохрома С

Было установлено, что олигомер действительно существует, его молекулярная масса близка к 23,2 кДа. Зная молекулярную массу мономера пептида СС36 (4,264 кДа) и сравнив её с молекулярными массами миоглобина (17,8 кДа) и цитохрома С (12,4 кДа) с учётом расстояний между тремя веществами, мы установили, что пептид СС36 образует гексамер. Существование пептида в виде ассоциата может быть благоприятным фактором для выработки иммунного ответа, при использовании пептида в качестве антигена.

Выводы:

1 Синтетический пептид СС36, соответствующий структурно неустойчивому фрагменту большого прионного белка человека, образует бета-структуру, которая занимает только 37% от его длины.

2 Обнаружены ассоциаты пептида СС36 (гексамеры), которые диссоциируют при температуре 37°C. Существование пептида в виде ассоциатов может быть благоприятным фактором для выработки иммунного ответа на его антигенные фрагменты.

3 Пептиды, аналогичные пептиду СС36 могут служить антигенами и поэтому могут рассматриваться в качестве кандидатов для создания вакцины от прионных заболеваний.

V. V. Poboinev

**STRUCTURE DETERMINATION OF PRION PEPTIDE CC36 ACCORD-
ING TO THE ANALYSIS OF THE SPECTRUM OF CIRCULAR DICHROISM**

Tutor: associate professor V. V. Khrustalev

Department of general chemistry

Belarusian State Medical University, Minsk

Литература

1. Adrover, M., Pauwels, K., Prigent, S., de Chiara, C., Xu, Z., Chapuis, C., Pastore, A., and Rezaei, H. Prion fibrillization is mediated by a native structural element that comprises helices H2 and H3. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, Vol. 285, P. 21004–21012.
2. Wiedemann, C., Bellstedt, P., Gorlach, M., CAPITO – A web server based analysis and plotting tool for circular dichroism data, *Bioinformatics*, 2013, Vol. 29, P. 1750-1757.
3. Shen, Y., Maupetit, J., Derreumaux, P., Tufféry, P. Improved PEP-FOLD approach for peptide and miniprotein structure prediction. *J. Chem. Theor. Comput.*, 2014, Vol. 10, P. 4745-4758.
4. Ghoorah, A. W., Smail-Tabbone, M., Devignes, M. D., Ritchie, D. W. Protein docking using case-based reasoning. *Proteins: Structure, Function, Bioinformatics*, 2013, Vol. 81, P. 2150 – 2158.