

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 D678H 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 D678H 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.

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.

СИСТЕМНОЕ РЕДОКС-МОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСА НА ОСНОВЕ СУКЦИНАТА НАТРИЯ, N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИНА И РЕСВЕРАТРОЛА ПРИ ТЯЖЕЛОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Шляхтун А. Г., Радута Е. Ф., Букша Е. В., Сутько И. П.,
Богдевич Е. В.

Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно, Беларусь

Введение. Алкогольная интоксикация (АИ) наносит значительный ущерб здоровью населения большинства стран мира. Известно, что этанол оказывает общесистемное действие, инициируя процессы ковалентной модификации макромолекул ацетальдегидом, воспаления, нарушения всех видов метаболизма, сдвигая редокс-баланс в тканях организма в сторону прооксидантного. При этом происходит увеличение выработки активных форм кислорода (АФК), инициируются процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), белков и других молекул, снижается активность антиоксидантных систем защиты (АОС) в тканях. Учитывая многогранность токсического действия этанола, нами разработано комплексное протекторное средство метаболического действия на основе сукцината натрия, N-ацетил-L-цистеина (АЦЦ) и ресвератрола.

Цель работы заключалась в исследовании системного редокс-модулирующего действия комплекса на основе сукцината натрия, АЦЦ и ресвератрола при моделировании тяжелой алкогольной интоксикации (ТАИ) у крыс.

Методы исследования. Исследования проведены на крысах-самцах Wistar с массой 180–200 г. Животные были разделены по 15 особей на 3 группы – контрольную, группу «ТАИ» и группу «ТАИ + Комплекс». ТАИ у крыс вызывали введением 30 % (в/о) раствора этанола в дозах до 12 г/кг/сут, в/ж, дважды в день (в 8:00 и 20:00), на протяжении 5 суток. На протяжении первых суток раствор этанола вводили в фиксированной дозе 5,0 г/кг. В последующие четверо суток этанол вводили в максимально переносимых дозах, которые