

Таблица 5 – Геометрические параметры (град) оптимальных конформаций молекулы Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro

Остаток	Конформации								
	B ₂₁ B ₂ B ₂ BLR		B ₂₁ B ₂ B ₂ RPR		R ₃₂ B ₁ B ₃ RBR				
Glu1	-99	139	-179	-99	139	-179	-88	-36	177
	-178	61	79	-178	61	79	73	-177	91
His2	-118	135	175	-118	135	177	-133	157	-179
	177	91		177	89		61	69	
Phe3	-101	128	180	-101	130	-173	-140	152	164
	180	87		-176	86		-57	89	
Pro4	-60	120	-176	-60	-62	-175	-60	-57	174
Gly5	60	69	-179	128	-72	173	-130	83	180
Pro6	-60	-54	179	-60	-51	179	-60	-55	179
U _{отн.}	0			0.9			0.6		

Примечание: значения двугранных углов даны в последовательности $\varphi, \psi, \omega, \chi_1, \chi_2, \dots$

Теоретический конформационный анализ гексапептидной молекулы Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro привел к такой структурной организации молекулы, которая не исключает реализацию молекулой целого ряда функций, требующих строго специфических взаимодействий с различными рецепторами.

Список литературы / References:

1. Шевченко К.В., Дулов С.А., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Радилев А.С., Мясоедов Н.Ф. Устойчивость His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro к действию лейцинаминопептидазы, карбоксипептидазы Y и ферментным системам назальной слизи, крови и плазмы крови крыс. *Биоорганическая химия*, 2016, т. 42, № 2, с. 171-181. [Shevchenko K.V., Dulov S., Andreeva L.A., Nagaev I.Yu., Shevchenko V.P., Radilov A.S., Myasoedov N.F. Stability of His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro to Leucine Aminopeptidase, Carboxypeptidase Y, Nasal Slime, Blood and Plasma of Rats. *Journal of Bioorganic Chemistry*, 2016, vol. 42, no. 2, pp. 171-181 (In Russ.)]
2. IUPAC-IUB, Quantiby, Units and Sybbols in Physical Chemistry. *Blackwell Scientific Publications*, 1998, vol. 39.
3. Akhmedov N.A., Tagiyev Z.H., Hasanov E.M., Akverdieva G.A. Theoretical conformational analysis of the bovine adrenal medulla 12 residue peptide molecule. *J.Molecular Structure*, 2003, vol. 646, pp. 75-80.
4. Akhmedov N.A., Ismailova L.I., Agayeva L.N., Gocayev N.M.. The spatial structure of the cardio active peptides. *Peptid and Protein Research*, 2010, vol. 11, pp. 87-93.
5. Гаджиева Ш.Н., Ахмедов Н.А., Масимов Э.А., Годжаев Н.М.. Пространственная структура молекулы Thr-Pro-Ala-Glu-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂. *Биофизика*, 2013, т. 58, вып. 4, с. 587-590. [Gadjieva Sh.N., Akhmedov N.A., Masimov E.A., Godjaev N.M. Spatial Structure of Thr-Pro-Ala-Glu-Asp-Phe-Met-Arg-Phe-NH₂. *Biophysics*, 2013, vol. 58, pp. 587-590 (In Russ.)]

ИССЛЕДОВАНИЕ ОЛИГОМЕРНОГО БЕЛКА С ПРИСОЕДИНЁННЫМИ АМИЛОИДОГЕННЫМИ ПЕПТИДАМИ.

Балобанов В.А., Михайлина А.О., Турчина А.И., Бычкова В.Е.
 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка РАН
 ул. Институтская, 4, г. Пушкино, Московская область, 142290, РФ
 e-mail: uralm62@rambler.ru

Аннотация. Поиск возможностей управлять образованием амилоидных белковых фибрилл является целью многих исследований. Для остановки и инициации процесса роста амилоидных фибрилл А-бета пептида на его основе были спроектированы мутантные пептиды, несущие замены аминокислотных остатков в ключевых положениях на пролин. Для исследования механизма действия этих пептидов была спроектирована гибридная конструкция в основе которой лежит термостабильный гексамерный белок Hfq к которому присоединены амилоидогенные пептиды. Эта конструкция была получена, выделена и очищена. Была протестирована стабильность и способность к агрегации при нагревании. Результаты экспериментов подтверждают предположения высокой стабильности и стойкости к агрегации полученной конструкции по сравнению с гибридным белком на основе тиоредоксина, который использовался ранее. Эти результаты позволяют использовать разработанную конструкцию в исследованиях амилоидообразования.

Ключевые слова: амилоидообразование, гибридные белки, белковая инженерия, тиоредоксин, Hfq.

STUDY OF OLIGOMERIC PROTEIN WITH ATTACHED AMYLOIDGENIC PEPTIDES.

Balobanov V.A., Mikhailina A.O., Turchina A.I., Bychkova V.E.

Institute of protein research RAS
Institutskaja st. 4, Pushchino, 142290, Russia
e-mail: uralm62@rambler.ru

Abstract. The search for ability to manage the formation of amyloid fibrils is the goal of many studies. To stop and initiate the growth process of amyloid fibrils of the A-beta peptide, mutant peptides with key amino acid substitutions to proline were designed. To investigate the mechanism of action of these peptides, a hybrid construction based on the thermostable hexameric Hfq protein to which these peptides are attached was designed. This fusion protein was obtained, isolated and purified. Its stability and ability to aggregate on heating was tested. The results of the experiments confirm the hypotheses of high stability and resistance to aggregation of the obtained structure in comparison with the thioredoxin-based hybrid protein that was used previously. These results will allow us to use the developed design in studies of amyloid formation.

Key words: amyloid formation, hybrid proteins, protein engineering, thioredoxin, Hfq.

Процесс амилоидообразования является одним из примеров самоорганизации полипептидных цепей [1]. Несмотря на значительное количество работ в этой области дальнейшее изучение требует новых подходов и инструментов. Отдельное направление исследований – поиск путей управления процессом образования амилоидной фибриллы [2].

Для достижения этой цели нами были спроектированы замены в составе А-бета пептида. Эти замены позволяют присоединение пептида только к одному из концов растущей амилоидной фибриллы и такое присоединение прекращает её дальнейший рост в этом направлении. Согласно теоретическому анализу этот пептид может являться ингибитором роста при добавлении к растущим фибриллам и инициатором роста при добавлении к раствору мономеров пептида дикого типа.

Мы решили использовать для кэпирования А-бета пептиды с заменами некоторых остатков цепи на пролины, препятствующие дальнейшему росту фибриллы либо в одну («+»), либо в другую («-») сторону. В качестве основы нашего дизайна мы выбрали лучше всего сделанную (из имеющихся для А-бета пептида дикого типа) структуру (PDB-код 2M4J [3]). На основе структурных данных предсказаны те позиции, где мутации на пролин не дадут образоваться следующим межмолекулярным водородным связям в сторону либо «+», либо «-» конца фибриллы. В зависимости от того, в какую сторону направлены элиминированные водородные связи, полученные мутантные белки будут кэпировать амилоидную фибриллу либо с «+» (предсказанные мутации V18P, A21P, S26P, G29P), либо с «-» (предсказанные мутации H13P, F19P, L34P) конца фибриллы. При таком кэпировании рост амилоидной фибриллы в соответствующую сторону будет ингибироваться (а её рост в противоположную сторону, наоборот, инициироваться). Таким образом, при одновременном кэпировании обоих концов, рост фибриллы будет остановлен вовсе. С помощью программного пакета WHAT IF / YASARA получены компьютерные модели теоретически спроектированных мутантов А-бета пептида, “4Pro” (с заменой на пролин всех четырёх остатков для кэпирования «+» конца фибриллы) и “3Pro” (с заменой всех трёх остатков для кэпирования «-» конца фибриллы). Введённые замены отмечены на структуре амилоидной фибриллы приведённой на рисунке 1.

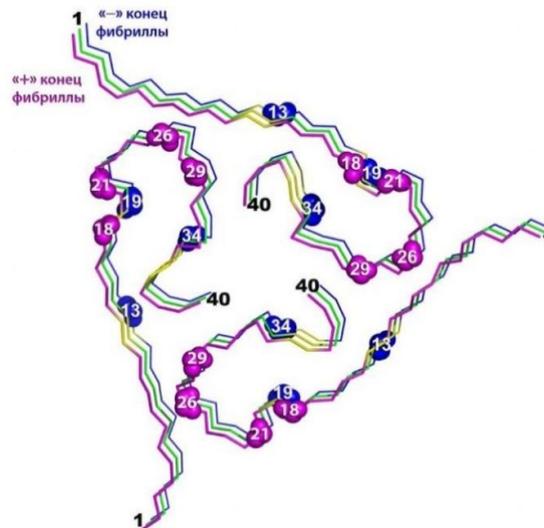


Рисунок 1 – Пространственная структура среза через амилоидную фибриллу, согласно имеющейся пространственной структуре для амилоидной фибриллы из А-бета пептида (код белка - 2M4J, изображены три слоя протофибриллы).

Жёлтым показаны β-структурные участки. «+» конец фибриллы (ближний к нам) показан фиолетовой линией, «-»-конец фибриллы (дальний от нас) – синей. Фиолетовыми шариками в каждой цепи отмечены аминокислотные остатки в позициях, где замена на Про приводит к кэпированию «+» (ближнего к нам) конца фибриллы. Синими шариками – те, где замена на Про приводит к кэпированию «-» (дальнего от нас) конца фибриллы

Одним из подходов к исследованию кинетики процессов амилоидной агрегации является присоединение к амилоидогенной части репортёрного белка [4]. Такая конструкция позволяет выявить локализацию пептида в составе фибриллы. Условия исследования механизма действия спроектированных пептидов предъявляют особые требования к репортёрному белку. Одно из основных требований – высокая стабильность и низкая склонность к агрегации, в первую очередь при нагревании. Также необходима относительная лёгкость детекции, поскольку планируемые соотношения меченого эпирующего пептида к исходному амилоидогенному пептиду достаточно небольшие.

Исходя из этих требований нами было предложено использование в качестве метки гексамерного белка семейства Hfq. В нашей работе был выбран белок Hfq из организма *Pseudomonas aeruginosa* (см. рис. 2). Основными критериями при отборе являлись небольшой размер и высокая термостабильность. Кроме того, белок Hfq стабилен при добавлении мочевины и понижении pH [5]. Гексомерная форма белка позволяет повысить локальную концентрацию пептида, что повысит его активность. Кроме того, наличие нескольких активных центров, которые могут быть включены в несколько фибрилл сразу, облегчит определение места локализации пептида на микрофотографиях, сделанных с использованием электронного или атомно-силового микроскопов. На С-конце белка Hfq имеется неструктурированный участок полипептидной цепи, который мы использовали в качестве естественного линкера. Между белком Hfq и А-бета пептидом был добавлен сайт для расщепления протеазой Ха. N-конец А-бета пептида, согласно известной структуре, расположен на поверхности амилоидной фибриллы, что позволяет минимизировать влияние присоединения Hfq на его амилоидогенные свойства.

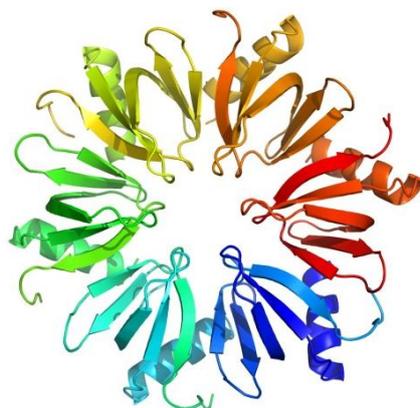


Рисунок 2 – Структура белка Hfq из организма *Pseudomonas aeruginosa* (PDB: 1u1s)

Получение генетической конструкции, несущей слитый ген А-бета пептида и белка Hfq *Pseudomonas aeruginosa*. Ген слитого пептида А-бета с белком Hfq из *P. aeruginosa* получен с помощью метода перекрывающихся участков с использованием 4 праймеров и 3 ПЦР реакций.

В соответствии с известной нуклеотидной последовательностью генов, кодирующих белок Hfq из *P. aeruginosa* (Pae Hfq) и пептид А-бета были синтезированы олигонуклеотиды-праймеры P1 (прямой праймер, комплементарный началу гена белка Hfq) и P2 (обратный праймер, комплементарный концу гена пептида А-бета), содержащие сайты для расщепления сайт-специфическими эндонуклеазами рестрикции BamHI и HindIII, необходимыми для вставки слитого гена в экспрессионный вектор pET-11a, а также праймеры P3 и P4 (см. табл. 1) (Синтол, Россия).

Праймеры P3 и P4 имеют перекрывающийся участок, объединяющий конец гена, кодирующего белок HFQ и начало гена, кодирующего пептид А-бета. Праймеры: P1 и P3 использовались для амплификации гена, кодирующего белок Hfq из *P. aeruginosa*, содержащего на 3'-конце участок начала гена, кодирующего пептид А-бета. Пара праймеров P2 и P4 использовалась во второй ПЦР для амплификации гена, кодирующего пептид А-бета содержащего на 5'-конце участок конца гена, кодирующего белок Hfq из *P. aeruginosa*. В качестве матрицы для ПЦР были использованы плазмиды pET-32 X_a/Lic, несущая ген пептида А-бета и pET-22b, несущая ген белка Hfq из *P. aeruginosa*.

Таким образом, оба амплифицированных фрагмента содержали перекрывающиеся участки. Перекрывающиеся фрагменты смешивали, денатурировали и отжигали друг на друга для получения гетеродуплекса, который затем использовали в третьей ПЦР, где они амплифицировались в полноразмерный фрагмент с помощью праймеров прямого P1 и обратного P2.

Выделение гибридного белка Hfq *P. aeruginosa* с А-бета пептидом. Для получения штаммов-суперпродуцентов использовали систему Штудьера. Штамм *E. coli* BL21(DE3) трансформировали плазмидой pET-11a, содержащей ген гибридного белка. Несколько колоний засеивали в жидкую среду LB (100 мкг/мл ампициллина) и растили при температуре 37 °С при интенсивном покачивании (200-250 об/мин) до оптической плотности A₅₉₀ ≈ 0,4 о.е., после чего к клеткам добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,3 мМ. После добавления индуктора клетки продолжали инкубировать при температуре 37 °С в течение 3 часов, по истечении которых осаждали центрифугированием (8000 g, 15 мин, 4 °С).

Клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе Sonic Dismembration 550. Клеточный дебрис осаждали низкоскоростным центрифугированием (14000 g, 30 мин, 4 °С). Осадок, содержащий тельца включения со слитым

белком РаеНfQ-A-beta-40, ресуспендировали в буфере содержащем 8М мочевины и 50мМ Tris-HCl pH 7.5 в течение ночи при +4°C. Очистку слитого белка проводили с помощью ионообменной хроматографии на Q-Sepharose в буфере содержащем 50 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 8М мочевины, при этом рекомбинантный белок был в проскоке. Далее проводили дробный диализ против буферов с меньшим содержанием мочевины и переводили слитый белок в буфер, содержащий Tris-HCl pH 8,8. Дальнейшую очистку РаеНfQ-A-beta-40 проводили с помощью гель-фильтрации на Superdex G-75. Электрофоретический анализ на различных стадиях выделения приведен на рисунке 3.

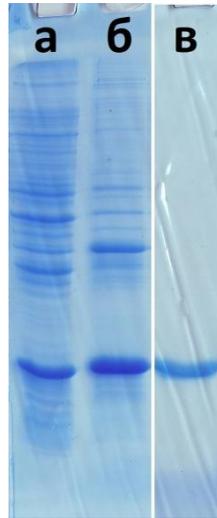


Рисунок 3 – Контроль на различных этапах выделения и очистки белка. а – супернатант, б – осадок, в – очищенный белок

Исследование термостабильности и стабильности к агрегации методом динамического рассеяния света.

Измерения динамического рассеяния света проводились на приборе Malvern zetasizer nano zsp. Термостатированная кювета имела размеры 0.3x0.3 см и объём 100 мкл. Скорость прогрева составляла 0.5 °C в минуту. Диапазон изменения температуры от 20 до 85 °C. Измерялось динамическое рассеяние под углом 173°. Данные анализировались программным обеспечением Malvern. По результатам строились зависимости интенсивности светорассеяния и размера частиц от температуры.

Для сравнения мы использовали широко применяющуюся систему на основе белка тиоредоксина. Эта система хорошо известна и показала свою эффективность. В этой системе белок тиоредоксин соединён с А-бета пептидом достаточно длинным линкером. Присоединение произведено, так же как и в случае с белком НfQ, С-конца белка носителя к N-концу пептида. Эта система значительно повышает растворимость А-бета пептида и используется нами при его выделении.

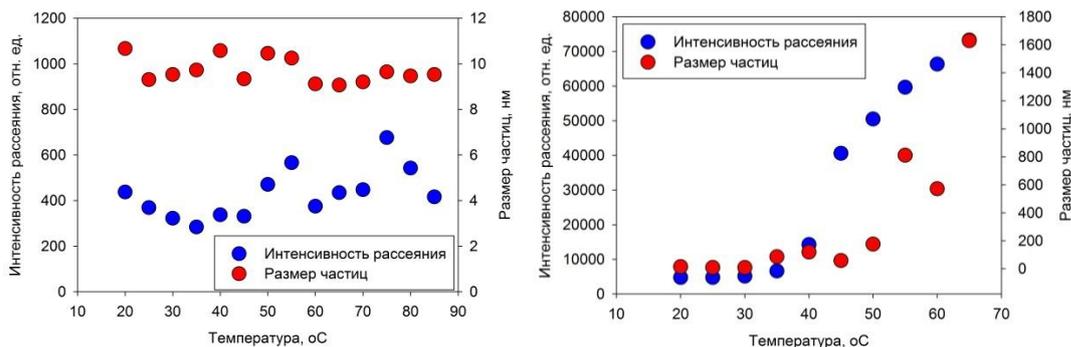


Рисунок 4 – Исследование стабильности при нагревании белков НfQ-Abeta 4pго(левый график) и Trx-Abeta 4pго(правый график) методом динамического светорассеяния. Измерялась интенсивность светорассеяния (синие точки) и определялся размер частиц(красные точки)

Результаты экспериментов приведены на рисунке 4. Сравнение показало, что система на основе белка НfQ сохраняет стабильность и не агрегирует при нагревании до температуры 85 °C. В таких же условиях гибриды А-бета пептида с тиоредоксином начинают агрегировать уже при нагревании до температуры 40 °C. Это тот результат, который мы ожидали при использовании термостабильной основы гибридного белка. Высокая стабильность полученной нами системы позволяет исследовать амилоидообразование пептидов прямо в составе гибридного белка.

Закключение. Нами спроектирована и создана система гибридного белка, состоящая из термостабильной основы и амилоидогенной части. Таким образом, предложенная нами система совмещает в себе свойства традиционных

гибридных белков, высокую стабильность и гексомерную форму. Как мы считаем, что такое сочетание позволит нам с успехом применить её в получении амилоидогенных пептидов и исследовании процессов амилоидообразования.

Список литературы / References:

1. Bywater R.P. Protein folding: a problem with multiple solutions. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2013, vol. 31, iss.4, pp. 351-362.
2. Zanuy D., Nussinov R., Alemán C. From peptide-based material science to protein fibrils: discipline convergence in nanobiology. *Phys Biol.*, 2006, vol. 3, iss. 1, pp. 80-90.
3. Lu J.X., Qiang W., Yau W.M., Schwieters C.D., Meredith S.C., Tycko R. Molecular structure of beta-amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue. *Cell*, 2013, vol. 154, iss. 6, pp. 1257-1268.
4. Boke E., Ruer M., Wühr M., Coughlin M., Lemaitre R., Gygi S.P., Alberti S., Drechsel D., Hyman A.A., Mitchison T.J. Amyloid-like Self-Assembly of a Cellular Compartment. *Cell*, 2016, vol. 166, iss. 3, pp. 637-650.
5. Murina V.N., Melnik B.S., Filimonov V.V., Uhlein M., Weiss M.S., Müller U., Nikulin A.D. Effect of conserved intersubunit amino acid substitutions on Hfq protein structure and stability. *Biochemistry*, Moscow, 2014, vol. 79, iss. 5, pp. 469-77, doi: 10.1134/S0006297914050113.

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛЕБАТЕЛЬНЫХ СПЕКТРОВ КОМПЛЕКСОВ КАРНОЗИНА С ЦИНКОМ

Демухамедова С.Д.

Институт Проблем физики, Бакинский Государственный Университет

ул. З.Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан

e-mail: svetlanabest@mail.ru

Аннотация. В работе квантовохимическим методом функционала плотности DFT/B3LYP в базисе 6-31G исследовано пространственное и электронное строение и колебательные спектры мономерных комплексов природного дипептида карнозина с цинком для двух таутомерных форм N^1H и N^3H его имидазольного кольца. Получены геометрические и энергетические параметры, рассчитаны величины парциальных зарядов на атомах, получены частоты и интенсивности полос поглощения ИК спектров комплексов и теоретические спектры комплексов обоих таутомерных форм. В работе приведены энергетические параметры, значения дипольных моментов и НОМО и ЛУМО орбиталей, а также парциальные значения зарядов на атомах исследуемых комплексов. Дипольные моменты молекул свидетельствуют о большей компактности пространственной конфигурации комплексов с формой имидазольного кольца N^3H . Произведена теоретическая интерпретация полученных теоретических спектров мономерных комплексов карнозина с цинком для двух таутомерных форм по распределению потенциальной энергии по колебательным координатам.

Ключевые слова: карнозин, комплексы с цинком, структура, квантово-химические расчеты, колебательные спектры.

THEORETICAL STUDY OF VIBRATIONAL SPECTRA COMPLEXES OF CARNOSINE WITH ZINC

Demukhamedova S.D.

Institute for Physical Problems, Baku State University

Z.Khalilov str., 23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan

e-mail: svetlanabest@mail.ru

Abstract. In this work the spatial and electronic structure and vibrational spectra of the monomeric complexes of the natural dipeptide of carnosine with zinc for two tautomeric forms of N^1H and N^3H of its imidazole ring were studied by the quantum-chemical method of the DFT / B3LYP density functional in the 6-31G basis. Geometric and energy parameters were obtained, the values of partial charges on atoms were calculated, the frequencies and intensities of the absorption bands of the IR spectra of the complexes and the theoretical spectra of the complexes of both tautomeric forms were obtained. The paper presents energy parameters, the values of dipole moments and HOMO and LUMO orbitals as well as partial values of charges on the atoms of the complexes under study. The dipole moments of the molecules indicate a greater compactness of the spatial configuration of the complexes with the shape of the imidazole N^3H ring. Theoretical interpretation of the obtained theoretical spectra of monomeric complexes of carnosine with zinc for two tautomeric forms on the distribution of potential energy over vibrational coordinates was made.

Key words: carnosine, complexes with zinc, structure, quantum-chemical calculations, vibrational spectra.

Карнозин - природный дипептид, состоящий из двух аминокислотных остатков - β -аланина и L-гистидина. Известно, что карнозин выполняет в организме человека важные физиологические функции [1]. Производные карнозина предложены для лечения старческой катаракты и диабетических осложнений [2]. Изучение природных гистидинсодержащих антиоксидантов, к числу которых относится карнозин, открывает перспективы для создания новых лекарственных препаратов с широким спектром фармакологической активности. В настоящее время ведутся интенсивные исследования комплексов карнозина с атомами металлов. Особенно большое значение в медицинской практике получили комплексы карнозина с цинком. Полимерный хелатный комплекс карнозина с цинком стал