

7. Helenius A., Simons K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Rev. Biomembr.*, 1975, vol. 415, no. 1, pp. 29-79.
8. Clark P. Protein folding in the cell: reshaping the folding funnel. *Trends Biochem. Sci.*, 2004, vol. 29, no.10, pp. 527-534.
9. Fedorov A.N., Baldwin T.O. GroE modulates kinetic partitioning of folding intermediates between alternative states to maximize the yield of biologically active protein1. *J. Mol. Biol.*, 1997, vol. 268, no. 4, pp. 712-723.
10. Smoot A.L. [et al.] The Binding of Bis-ANS to the Isolated GroEL Apical Domain Fragment Induces the Formation of a Folding Intermediate with Increased Hydrophobic Surface Not Observed in Tetradecameric GroEL. *Biochemistry (Mosc.)*, 2001. vol. 40, no. 14, pp. 4484-4492.
11. Pettersen E.F. [et al.] UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, 2004, vol. 25, no. 13, pp. 1605-1612.
12. Sharapova O.A., Yurkova M.S., Fedorov A.N. A minichaperone-based fusion system for producing insoluble proteins in soluble stable forms. *Protein Eng. Des. Sel.*, 2016, vol. 29, no. 2, pp. 57-64.
13. Kyte J., Doolittle R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 1982, vol. 157, no. 1, pp. 105-132.
14. Mallon R.G., Wojciechowicz D., Defendi V. DNA-binding activity of papillomavirus proteins. *J. Virol.*, 1987, vol. 61, no. 5, pp. 1655-1660.

НЕОБЫЧНАЯ СТРУКТУРА АГРЕГАТОВ, ОБРАЗОВАННЫХ ФРАГМЕНТОМ Аβ16-25 ПЕПТИДА, И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Селиванова О.М., Горбунова Е.Ю., Мустаева Л.Г., Григорашвили Е.И.,
Суворина М.Ю., Никулин А.Д., Сури́н А.К., Галзитская О.В.

ФГБУН Институт белка РАН

Просп. науки, 4, г. Пуцино, 142290, РФ

Филиал ФГБУН Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Просп. науки, 6, г. Пуцино, 142290, РФ

e-mail: seliv@vega.protres.ru; ogalzit@vega.protres.ru

Аннотация. С помощью биоинформатических методов исследования был найден фрагмент участка последовательности Аβ1-42 пептида, отвечающий за его амилоидогенные свойства – KLVFFAQNVG (Аβ16-25). Данный фрагмент был химически синтезирован и получен в достаточных количествах для изучения процесса его амилоидообразования. По данным электронной микроскопии (ЭМ) этот фрагмент в условиях 5 % DMSO и 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 формирует не характерную для большинства амилоидов морфологию в виде широких плоских лент/пленок до 150 и более нм шириной. Такая морфология представляет интерес как бионаноматериал для адсорбции различных биологических объектов от белков и их комплексов с белками и нуклеиновыми кислотами до вирусных частиц. Несмотря на необычность морфологии полимеров, образованных пептидом Аβ16-25, препараты данного фрагмента по данным рентгеноструктурного анализа показывают наличие двух основных рефлексов (4,6-4,8 Å и 8-12 Å), характерных для кросс-β структуры амилоидных фибрилл.

Ключевые слова: Аβ пептид, амилоидогенные фрагменты Аβ1-42 пептида, амилоиды, бионаноматериалы, биоинформатика.

UNUSUAL STRUCTURE OF AGGREGATES FORMED BY THE FRAGMENT OF Aβ16-25 PEPTIDE AND PERSPECTIVES FOR ITS USE IN BIOTECHNOLOGY

Selivanova O.M., Gorbunova E.Yu., Mustaeva L.G., Grigorashvili E.I.,
Suvorina M.Yu., Nikulin A.D., Surin A.K., Galzitskaya O.V.

“Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences

Nauka Pr. 4, Pushchino, 142290, Russia

Branch of M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences

Nauka Pr. 4, Pushchino, 142290, Russia

e-mail: seliv@vega.protres.ru; ogalzit@vega.protres.ru

Summary. Using bioinformatics methods, fragment KLVFFAQNVG (Aβ16-25) was found in the sequence of peptide Aβ1-42 responsible to its amyloidogenic properties. The fragment was chemically synthesized and obtained in sufficient amounts for studying the process of its amyloid formation. According to the electron microscopy data, under 5% DMSO and 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 this fragment forms morphology uncharacteristic of most amyloids. This morphology looks like wide flat ribbons/films up to 150 nm and higher. The morphology is of interest as bionanomaterial for adsorption of different biological objects from proteins and their complexes with proteins and nucleic acids to viral particles. Though the morphology of polymers formed by the Aβ16-25 fragment is unusual, according to X-ray diffraction data its preparations display the presence of two main reflections (4.6-4.8 Å and 8-12 Å) characteristic of cross-β structure of amyloid fibrils.

Key words: Aβ peptide, amyloidogenic fragments of Aβ1-42 peptide, amyloids, bionanomaterial, bioinformatics.

Причины множества нейродегенеративных заболеваний человека связаны с необычным поведением соответствующих белков (пептидов). При таких заболеваниях как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, синдрома Хантингтона и других амилоидозов в мозгу человека выявляются большие агрегаты (бляшки, депозиты) соответствующих пептидов, сформированных из плотно взаимодействующих между собой фибрилл. Болезнь Альцгеймера ассоциирована с образованием бляшек из $A\beta_{1-42}$ пептида. Установлено, что последовательности белков содержат фрагменты, наиболее склонные к формированию фибриллярной структуры [1]. Такие потенциальные амилоидогенные фрагменты выявляются с помощью биоинформатических методов исследования. Амилоидогенных последовательностей в белке может быть несколько. Так в последовательности $A\beta_{1-42}$ пептида их обнаружено два таких фрагмента ($A\beta_{16-25}$, $A\beta_{31-40}$ или $A\beta_{33-42}$) [2]. Такие фрагменты представляют большой интерес для исследователей, поскольку они удобны не только для изучения механизма процесса формирования фибрилл, но и для изучения ряда биохимических, биофизических и, наконец, молекулярных процессов амилоидообразования. Следствием этих комбинированных методов исследования является многочисленные работы по разгадыванию процесса формирования фибрилл, влияния на него различных факторов окружающей среды, определение наиболее токсичных интермедиатов на пути формирования фибрилл. А также поиск и дизайн терапевтических средств борьбы с токсичностью, вызванной агрегацией белков, и, наконец, разработка различных способов предотвращения развития нейродегенеративных заболеваний.

Существует многочисленные исследования как целых $A\beta_{1-40}$ и $A\beta_{1-42}$ пептидов, так и их фрагментов. Данные пептиды являются очень сложными объектами для изучения, поскольку их поведение сильно зависит не только от условий исследования (ионные условия, температура, pH, агитация), но и от их происхождения (нативный, рекомбинантный, синтетический), от способа выделения и фирмы производителя [3] и т.д.

Выявленный с помощью биоинформатических методов амилоидогенный фрагмент $A\beta_{16-25}$ был исследован нами методами ЭМ и рентгеноструктурного анализа. Данный фрагмент был синтезирован и исследован в условиях 5% DMSO, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 при 37°C и концентрации препарата 0,25-0,50 мг/мл. Для ЭМ анализа препараты пептида готовили методом негативного контрастирования 1% водным раствором уранилацетата. ЭМ анализ препарата $A\beta_{16-25}$ пептида показал необычную морфологию этого фрагмента (см. рис. 1).

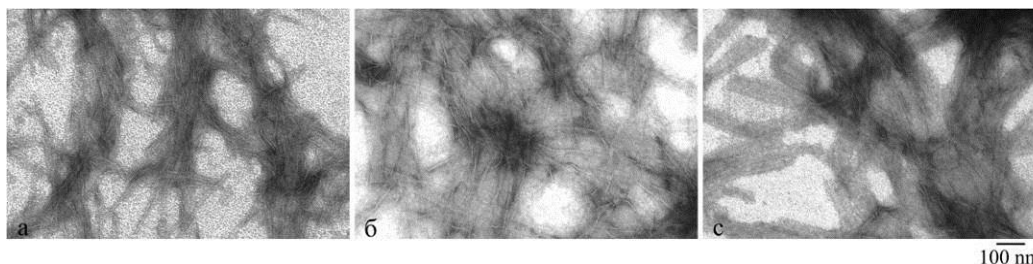


Рисунок 1 – Электронно-микроскопические изображения полей препарата $A\beta_{16-25}$ фрагмента $A\beta_{1-42}$ пептида при $C=0,5$ мг/мл в условиях 5% DMSO, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, инкубация при 37°C. Время инкубации: а – «0» часов; б, в – 8 и 24 часа

Согласно данным ЭМ сразу («0» часов инкубации) формируются вытянутые частицы до 300 нм длиной и диаметром 6-15 нм, похожие на фибриллы (см. рис. 1,а). Через 8 часов инкубации заметны плоские похожие на пленки полимеры препарата (см. рис. 1,б). Длина таких плоских лент/пленок доходит до 0,5 мкм, а ширина увеличивается до 50 нм. Через 24 часа инкубации длина пленок увеличивается до 1 мкм, а ширина может доходить до 150 нм (см. рис. 1,с). Пленки очень тонкие, что заметно по контрастированию препарата уранилацетатом. Фактически пленки сливаются с пленкой-подложкой (формваровая плёнка) для адсорбции препарата (см. рис. 2). О приблизительной толщине пленок можно судить по местам их перегиба. На рисунке 2 видно, что пленки имеют разную ширину, а толщина пленок в местах перегиба составляет ~ 3 нм.

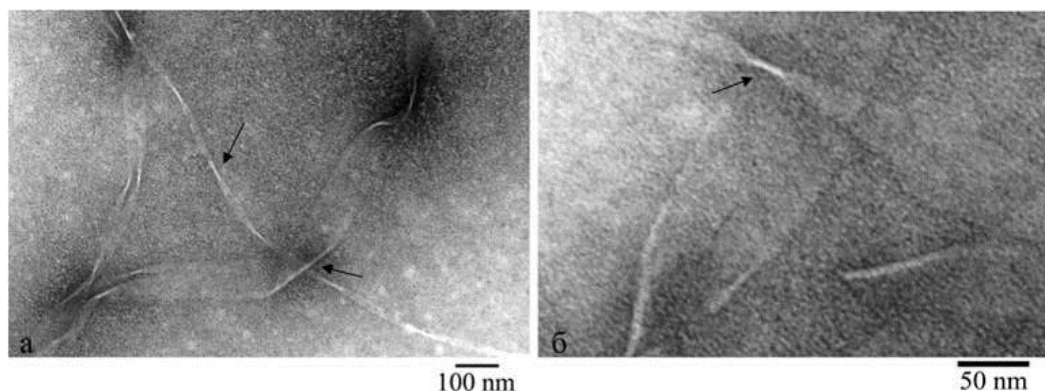


Рисунок 2 – Электронно-микроскопические изображения препарата $A\beta_{16-25}$ пептида с большим увеличением. Препарат в условиях 5% DMSO, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, инкубация 24 часа при 37°C, 0,25 мг/мл. а – на поле представлены полимерные пленки разного диаметра; б – на поле видно, что пленки тонкие и почти сливаются с фоном. Толщина пленок в местах их перегиба около 3 нм (стрелки).

Одной наиболее важных характеристик амилоидов является наличие кросс- β -структуры, которая выявляется с помощью рентгеноструктурного анализа [4]. Амилоидные структуры имеют два характерных рефлекса на картине дифракции рентгеновских лучей: рефлекс 4,6–4,8 Å, который отражает расстояние между β -тяжами и 8–12 Å, который соответствует расстоянию между соседними β -листами. Данные рентгеноструктурного анализа препарата А β 16-25 пептида показали наличие двух рефлексов, один из которых (10 Å) соответствует расстоянию между β -листами, а другой близок рефлексу, соответствующему расстоянию между β -тяжами в β -листах (4,4 Å), что свидетельствует, что скорее всего в полимере А β 16-26 пептид присутствует кросс- β структура (см. рис. 3). Т.е. несмотря на необычную морфологию, полимер этого пептида является амилоидом.

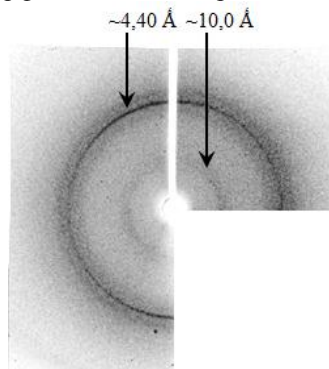


Рисунок 3 – Изображение дифракции рентгеновских лучей для препарата А β 16-25 пептида. Препарат приготовлен в условиях 5% DMSO, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, инкубация в течение 48 часов при 37°C, 5 мг/мл.

В настоящее время установлено большое количество белков и пептидов, полимеризация которых в фибриллярные образования приводят к развитию различных заболеваний (амилоидозам). Однако не всегда фибриллярные образования являются токсичными для организма. Известно большое количество так называемых функциональных амилоидов. Такие амилоиды обнаружены у многих представителей животного и растительного мира, а также у дрожжей и бактерий. Для ряда пептидных и белковых гормонов обычным функциональным состоянием является их длительное хранение в секреторных гранулах эндокринной системы (глюкагон, соматостатин и др.). Многие микроорганизмы имеют на своей поверхности амилоидные белки [5]. Они помогают микроорганизмам не только взаимодействовать с инертными поверхностями (пластик, стекло), но и необходимы для адгезии на поверхностях клеток хозяина [5]. При этом повышается риск возникновения ряда заболеваний, например, туберкулеза [6]. В последнее время уделяется большое внимание исследованию биопленок, сформированных амилоидными белками микроорганизмов, например, белком курлином из *E. coli* [7]. Поскольку биопленки предназначены для облегчения прикрепления бактериальных клеток к поверхности клеток хозяина, что способствует проникновению инфекции в его организм, то проводятся исследования для поиска условий препятствующих этому процессу. В последнее время обратили внимание на возможность использования биопленок в качестве нанобиоматериалов для исследований разных биологических процессов. Например, для усиления ретровирусной трансдукции или прямой визуализации на поверхности нанопленок вирусных частиц [8]. Это только начало применения нанопленок. Однако, их дизайн позволит получить нанопленки с различными заданными свойствами, что безусловно является перспективной областью исследований.

Таким образом, предсказанный нами амилоидогенный фрагмент А β 16-25 является перспективным объектом не только для разгадывания процесса полимеризации пептидов/белков, но и является перспективным объектом для использования его в качестве наноматериала для изучения ряда биологических процессов.

Работа поддержана Российским Научным Фондом грант № 14-14-00536.

Список литературы / References:

1. Sanchez de Groot N., Pallarès I., Avilès F.X., Vendrell J., Ventura S. Prediction of “hot spots” of aggregation in disease-linked polypeptides. *BMC Struct. Biol.*, 2005, pp. 5-18.
2. Garbuzynskiy S.O., Lobanov M.Y., Galzitskaya O.V. FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence. *Bioinformatics*, 2010, vol. 26, pp. 326-332.
3. Suvorina M.Yu., Selivanova O.M., Grigorashvili E.I., Nikulin A.D, Marchenkov V.V., Surin A.K., Galzitskaya O.V. Studies of Polymorphism of Amyloid- β 42 Peptide from Different Suppliers. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2015, vol. 47, pp. 583-593.
4. Sunde M., Blake C. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv. Protein Chem.*, 1997, vol. 50, pp.123-159.
5. Рекстина В.В., Горковский А.А., Безсонов Е.Е., Калебина Т.С. Амилоидные белки поверхности микроорганизмов: структура, свойства и значение для медицины. *Вестник РГМУ*, 2016, т. 1, с. 4-13. [Rekstina V.V., Gorkovskii A.A., Bezsonov E.E., Kalebina T.S. Cell surface amyloid proteins of microorganisms: structure, properties and significance in medicine. *Vestnik RGMU*, 2016, vol. 1, pp. 4-13. (In Russ.)]
6. Alteri C.J., Xicohténcatl-Cortes J., Hess S., Caballero-Olín G., Girón J.A., Friedman R.L. Mycobacterium tuberculosis produces pili during human infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, vol. 104 (12), pp. 5145-50.

7. Collinson S.K., Doig P.C., Doran J.L., Clouthier S., Trust T.J., Kay W.W. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of Salmonella enteritidis to fibronectin. *J Bacteriol.* 1993, vol. 175 (1), pp. 12-8.

8. Dai B., Li D., Xi W., Luo F., Zhang X., Zou M., Cao M., Hu J., Wang W., Wei G., Zhang Y., Liu C. Tunable assembly of amyloid-forming peptides into nanosheets as a retrovirus carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, vol. 112, pp. 2996-3001.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ АППРОКСИМАЦИИ КРИВОЙ ДИССОЦИАЦИИ ОКСИГЕМОГЛОБИНА НЕКОТОРЫМИ ФУНКЦИЯМИ, ИМЕЮЩИМИ ФИЗИЧЕСКИЙ СМЫСЛ

Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Артюхов В.Г.
Воронежский государственный университет
Университетская пл., 1, г. Воронеж, 394006, РФ
e-mail: lavrinenko_ia@bio.vsu.ru

Аннотация. Численными методами выполнена аппроксимация кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО) функциями, имеющими физический смысл: Гюфнера, Хилла, Эдера, Бернарда, Высочиной, Подрабинека-Каменского, Кислякова и Ханина. Наилучшие результаты по степени достоверности аппроксимации в диапазоне парциальных давлений кислорода от 0 до 622,5 мм рт. ст. показали уравнения Эдера, Бернарда и Хилла. Близость величин R^2 для этих моделей и общность в представлении процесса оксигенации, описываемого данными функциями, могут косвенно указывать на характер присоединения кислорода гемоглобином, а именно на его ступенчатость, обусловленную структурными перестройками макромолекулы гембелка при связывании ею лигандов в ходе равновесных реакций. Предложенный подход в оценке эффективности аппроксимации КДО также может быть использован и для решения сходных по своей постановке задач, т.е. тестирования функциональных (регрессионных) зависимостей, претендующих на модели, имеющие физический смысл.

Ключевые слова: аппроксимация, кривая диссоциации оксигемоглобина, коэффициент детерминации

EVALUATION OF OXYHEMOGLOBIN DISSOCIATION CURVE FITTING SOME PHYSICAL MEANING FUNCTION

Lavrinenko I.A., Vashanov G.A., Artyukhov V.G.
Voronezh State University
University Sq., 1, Voronezh, 394006, Russia
e-mail: lavrinenko_ia@bio.vsu.ru

Abstract. We present numerical approximations of oxyhemoglobin dissociation curve (ODC) by Hüfner's, Hill's, Adair's, Bernard's, Vysochina's, Podrabinek-Kamensky's, Kislyakov's and Hanin's functions that have clear physical meaning. The best approximations in the range of oxygen partial pressures between from 0 to 622.5 mm Hg are achieved using Adair's, Bernard's and Hill's equations. These models are characterized by close values of R^2 and common description of the oxygenation process. This fact indirectly indicates a stepwise nature of the hemoglobin oxygen joining due to structural rearrangements of the hemoprotein macromolecule under its ligands binding during equilibrium reactions. The proposed approach to assessing the effectiveness of the ODC approximation may also be used to solve similar problems, i.e., functional testing (regression) models claiming to have a physical meaning.

Keywords: approximation, dissociation curve of oxyhemoglobin, the coefficient of determination

Способность гемоглобина обратимо связывать кислород лежит в основе функционирования кислородтранспортной системы крови. Степень связывания кислорода гемоглобином представляет собой зависимость, где аргументом является, чаще всего, парциальное давление кислорода, а функцией – процентное содержание оксиформы гембелка. Данная зависимость получила название «Кривая диссоциации оксигемоглобина» (КДО).

КДО может быть аппроксимирована множеством экстра- и интерполирующих функций, что необходимо в нахождении координат точек кривой, определяющих как структурно-функциональные свойства молекулы (степень полунасыщения гемоглобина кислородом – P_{50} и зарядное напряжение – P_{95}), так и являющихся физиологически важными, оценивающими уровень оксигенации гембелка в артериальной и венозной крови.

Тем не менее, такие модельные кривые не имеют физического смысла и не позволяют описать и понять сущность процессов оксигенации не только на уровне микросостояний, но и даже на уровне макроконстант.

Предложены различные математические модели КДО [1], опирающиеся, в той или иной степени, на характер взаимодействия O_2 с молекулой гемоглобина. Однако сравнение эффективности аппроксимации экспериментальных данных этими функциями, по нашему мнению, проведено не в полной мере.

В связи с этим, нами была предпринята попытка провести сравнительный анализ функциональных моделей КДО по критериям: физическая трактовка, уровень достоверности аппроксимации, количество используемых констант.