КРИСТАЛЛОГРАФИЯ, 2021, том 66, № 5, с. 815-820

_____ СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ____ Соединений

УДК 577

СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ТЕТРАПЕПТИДОВ, СПОСОБНЫЕ ИНДУЦИРОВАТЬ КОНФОРМАЦИОННЫЕ ПЕРЕХОДЫ БЕТА-ДОМЕНА АЛЬФА-ЛАКТАЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА

© 2021 г. Я. А. Забродская^{1,2,3,4}, А. В. Швецов^{1,2,4}, Ю. П. Гармай¹, Д. В. Лебедев^{1,4}, Р. Даттани⁵, В. В. Егоров^{1,4,6,*}

 1 Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт" — ПИЯ Φ , Гатчина, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

³ Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт", Москва, Россия

⁵ Европейский центр синхротронного излучения, Гренобль, Франция

⁶ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

**E-mail: egorov_vv@pnpi.nrcki.ru* Поступила в редакцию 12.09.2020 г. После доработки 23.12.2020 г. Принята к публикации 23.12.2020 г.

При помощи метода малоуглового рентгеновского рассеяния показано, что тетрапептид, являющийся индуктором фибриллогенеза для фрагмента бета-домена альфа-лактальбумина человека, активен в форме супрамолекулярных комплексов. Образование таких комплексов не детектировалось при использовании микроскопии и аналитической гель-фильтрации. Молекулярно-динамическое моделирование поведения ансамбля изучаемых тетрапептидов методом свободной диффузии подтвердило их склонность к образованию олигомеров, наблюдаемую в эксперименте. Полученные данные и методические подходы могут быть применены при разработке новых препаратов пептидной природы, способных к модулированию активности белков путем воздействия на их пространственную структуру.

DOI: 10.31857/S002347612105026X

введение

Способность биомакромолекул к самоорганизации играет ключевую роль в функционировании живых систем. Для изучения надмолекулярных комплексов применяется широкий спектр биофизических и биохимических методов, таких как электронная и атомно-силовая микроскопия, хроматография, электрофорез в геле, динамическое светорассеяние. Однако некоторые олигомерные комплексы, существующие только в состоянии динамического равновесия олигомермономер в растворе, разрушаются при исследовании, так как взаимодействия между мономерами менее энергетически выгодны, чем взаимодействия между мономером и, например, поверхностью хроматографического сорбента или подложкой для проведения исследования с помощью микроскопии. В то же время динамическое светорассеяние не обладает достаточным разрешением для определения морфологических характеристик изучаемых комплексов.

В последнее время появляется все больше данных о роли коротких пептидов (образовавшихся, например, в результате ограниченного протеолиза белков [1] или при реализации альтернативных механизмов трансляции [2]) в регуляции активности белков, опосредованной воздействием на их пространственную структуру [3]. Индукция конформационных переходов в целевых вирусных белках или маркерных белках опухолей с применением пептидов используется для создания новых препаратов, направленных на борьбу с инфекционными и онкологическими заболеваниями [4–6].

В [7, 8] для изучения процесса индуцированных пептидами конформационных переходов в полипептидах использовался модельный пептид WT (участок бета-домена альфа-лактальбумина человека протяженностью 17 аминокислотных остатков (GYDTQAIVENNESTEYG). Выбор этого пептида в качестве модели обусловлен, в том числе, перспективой его использования в качестве основы для противоопухолевого препарата, специфически воздействующего на клетки опу-

· •	
Пептид	Аминокислотная последовательность
WT	GYDTQAIVENNESTEYG
L	GYDT

Таблица 1. Первичные структуры пептидов WT, L и R

Примечание. Жирным шрифтом выделен аминокислотный остаток, замененный на близкий по свойствам в пептиде R.

TDYG

холей молочной железы [9]. Было показано, что добавление в раствор тетрапептидов, гомологичных по первичной структуре С- или N-концевым участкам пептида WT (пептиды L и R соответственно), приводит к быстрому переходу WT в бета-структурированную форму и индуцирует образование амилоидоподобных фибрилл. Первичные структуры пептидов WT, L и R приведены в табл. 1. Аминокислотная замена остатка глутаминовой кислоты TDYG на аспарагиновую TEYG обусловлена тем, что пептид TEYG оказался крайне гигроскопичным и неустойчивым в растворе.

При индукции фибриллогенеза не наблюдалось значимого уменьшения числа молекул индуктора в растворе и разницы в морфологии фибрилл, образовавшихся в присутствии и в отсутствие индуктора [10]. Была предложена модель, объясняющая способность тетрапептидов индуцировать конформационные переходы [11]. Вкратце при помощи молекулярно-динамического (МД) моделирования было показано, что тетрапептиды способны стабилизировать бетаструктурированную, способную к образованию надмолекулярных комплексов, форму пептида WT. При этом в рамках модели после образования олигомеров WT тетрапептиды высвобождаются из комплексов и способны индуцировать фибриллогенез дальше по механизму, сходному с ферментативной реакцией. В то же время предложенная модель не могла объяснить тот факт, что индукторы при добавлении в концентрациях ниже критической (менее 0.5 мг/мл) не вызывали увеличения скорости фибриллогенеза. Данное исследование посвящено уточнению модели индукции фибриллогенеза в описываемой модельной системе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пептиды WT, L и R. Пептиды GYDTQAIVEN-NESTEYG (WT) и GYDT (L), TDYG (R) были синтезированы в НПФ "Верта", чистота выше 90%.

Атомно-силовую микроскопию (ACM) пептидных агрегатов WT проводили на микроскопе Bio-Solver Pro с измерительной головкой Smena-B с использованием полуконтактного режима, зонд NSG03 (NT-MDT, Россия). Образцы растворяли в концентрации 0.7 мг/мл в фосфатно-солевом буфере (**ФСБ**), pH 7.4, наносили на свежерасщепленную слюду (SPI Supplies), инкубировали в течение 1 мин, а затем промывали большим количеством деионизированной воды MilliQ.

Лазерная корреляционная спектроскопия. Измерения квазиупругого рассеяния света проводили с использованием ЛКС-спектрометра ЛКС-03 (Intox, Россия). Пептиды L и R растворяли в ФСБ в концентрациях 0.1, 0.2, 0.5, 0.7 и 1 мг/мл. Спектральный анализ проводили с использованием программного обеспечения прибора.

Спектрофотометрия. Концентрацию пептидов определяли с использованием спектрофотометра Hitachi U-3310 в 1 см кварцевых кюветах. Спектры обрабатывали с применением программного обеспечения прибора, коэффициент молярной экстинкции (1280 М⁻¹ см⁻¹) был вычислен в пептидном калькуляторе PepCalc [12].

Малоугловое рассеяние рентгеновских лучей (МУРР). Эксперименты по МУРР проводили на источнике синхротронного излучения ESRF (Гренобль, Франция) на спектрометре ID02 в соответствии с правилами использования [13]. Регистрацию спектров пептидов, растворенных в ФСБ в концентрациях 0.7 мг/мл, проводили с использованием детекторов, расположенных на расстоянии 1.2 и 5 м, в результате диапазон переданных импульсов *q* составил 0.014-6 нм^{-1} (*q* = $= 4\pi \sin(\theta)/\lambda$, где 2 θ – угол рассеяния, λ – длина волны). Спектры регистрировали при комнатной температуре. Для контроля радиационных повреждений образца в каждой серии измерений было зарегистрировано 50 кривых МУРР с экспозицией 15 мс и интервалом 1 с. При отсутствии систематических изменений во всех спектрах серии полученные результаты усредняли. Обработка данных включала в себя вычитание сигнала от чистого растворителя (ФСБ), зарегистрированного в аналогичных условиях, а затем устранение некогерентного рассеяния с использованием линейного приближения спектров в координатах Iq⁴ $vs q^4$, как описано в [14]. Дальнейшую обработку и аппроксимацию экспериментальных данных проводили с помощью программного обеспечения SasView [15] и Origin2015.

Молекулярное моделирование. Модели пептидов были построены с помощью программы Рутоl [16]. В дальнейшем с помощью GROMACS [17] была построена система в виде кубического бокса размером 100³ Å³, содержащая по 32 мономера пептидов TDYG и GYDT, а также атомы Na⁺ и Cl⁻ в числе, соответствующем 50 мМ концентрации NaCl. Для моделирования взаимодействия тетрапептидов между собой применяли метод МД в ре-

R



Рис. 1. Результаты обработки спектров динамического светорассеяния пептидов L (0.5 мг/мл) (а) и R (0.5 мг/мл) (б).

жиме свободной диффузии. Для этого использовали следующий протокол.

Подготовленную стартовую конфигурацию помещали в бокс с молекулами воды. Размер бокса составлял 100³ Å³. Для пептидов использовали поле amber14sb [18], для воды – tip3p [19]. Далее следовали этапы минимизации энергии системы и первая стадия уравновешивания. Начальные скорости рассчитывали, исходя из распределения Максвелла для температуры 310 К. Чтобы избежать разрушения системы, на все тяжелые атомы пептидов накладывали дополнительный потенциал в виде чаши, который ограничивал их движение. При расчете использовали термостат и баростат Берендсена [20]. Уравновешивание растворителя проводили в течении 5 нс симуляции с почти неподвижным белком. Последнюю полученную конфигурацию использовали в качестве стартовой на второй стадии уравновешивания, при этом снимали лействие потенциалов. ограничивающих движение атомов. Использовали термостат Нозе-Гувера [21-24] и баростат Паринелло-Рамана [25, 26]. Уравновешивание проводили в течение 10 нс. Далее проводили МД-симуляцию в течение 500 нс. Результаты данного этапа моделирования использовали в дальнейшем для анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наличие критической концентрации индуктора конформационных переходов, ниже которой он не оказывал эффекта на четвертичную структуру полипептида, наблюдаемое при изучении воздействия пептидов L и R на пептид WT, было обнаружено и ранее при изучении низкомолекулярных индукторов конформационных переходов [27]. Тогда было показано, что активность низкомолекулярного индуктора триазавирина проявляется только в виде супрамолекулярных комплексов, образующихся при превышении определенной критической концентрации. Этот эффект был обусловлен необходимостью кооперативности взаимодействия индуктор-полипептид для воздействия на конформацию; кооперативность обусловливалась существованием индуктора в виде нековалентно связанных линейных гомоолигомеров [28]. Вероятно, пептиды L и R в концентрациях, превышающих критическую, существуют в растворе в виде супрамолекулярных комплексов, способных модулировать четвертичную структуру пептида WT. В пользу существования олигомерных форм пептидов R и L свидетельствовало наличие светорассеяния при превышении критических концентраций для пептидов (0.5 мг/мл для L, 0.2 мг/мл для R). Результаты обработки спектров приведены на рис. 1.

Различие в критических концентрациях может быть обусловлено наличием внутримолекулярных взаимодействий в молекулах пептида L (что следует из результатов МД-моделирования). Повидимому, при образовании структур более высокого порядка такие взаимодействия могут препятствовать олигомеризации при более низких концентрациях, характерных для пептида R, образующего преимущественно межмолекулярные связи.

При исследовании пептида R методом гельфильтрации молекулярная масса олигомеров соответствовала тетрамеру пептида, и более высокомолекулярные формы не детектировались. Исследование надмолекулярных структур тетрапептидов-индукторов методом электронной микроскопии [10] не показало наличия олигомеров пептида R. Результаты АСМ образцов пептидов L и R свидетельствовали об отсутствии упорядоченных структур на подложке и были сравнимы с результатами микроскопии чистого буфера



Рис. 2. Спектры МУРР на растворах пептидов L (квадраты) и R (круги). На врезке расчетные спектры олигомерных агрегатов, построенных методом молекулярного моделирования (см. подпись к рис. 4). Интенсивность рассеяния (*I*) спектра пептида L была умножена на 2 для наглядного представления данных.

(данные не показаны). В то же время все эти результаты не позволяли объяснить факт наличия критической концентрации индуктора фибриллогенеза.

Результаты МУРР (рис. 2) подтверждают присутствие в растворах обоих пептидов в концентрации выше критической крупных структур. В диапазоне малых амплитуд переданных импульсов (q < 0.3 нм⁻¹) зависимость интенсивности рассеяния I от вектора рассеяния q близка к степенной с показателем степени 2.5. Данные в этом диапазоне могут быть аппроксимированы моделью рассеяния масс-фракталом ($D = 2.50 \pm 0.02$ и $D = 2.42 \pm 0.10$ для пептидов L и R соответственно) ограниченного размера [29], при этом характерные корреляционные длины ξ для агрегатов, образуемых пептидами L и R, оказываются близки между собой (70 \pm 5 и около 110 нм соответственно) и находятся в хорошем соответствии с результатами динамического светорассеяния. Для пептида L характерный размер отдельных рассеивающих объектов составлял ~10-15 нм.

В диапазоне более высоких амплитуд переданного импульса ($q = 0.5-1.2 \text{ нм}^{-1}$) интенсивность рассеяния для пептида L в целом следует степенному закону $I \sim q^{-1}$, что соответствует линейным структурам, которые могут образовываться за счет взаимодействия между мономерами пептидов, формируя олигомерную цепь. Изолированные линейные олигомеры пептидов, полученные в результате молекулярного моделирования, спектры которых приведены на рис. 2 (врезка), в эксперименте не наблюдаются и, как можно предположить, не являются устойчивыми, ассоциируя в более крупные глобулярные агрегаты.

Отметим, что хроматографический анализ растворов пептидов L и R в концентрациях, превышающих критические, показывал наличие в растворе только тетрамеров указанных пептидов, причем спектрофотометрическое определение концентрации пептидов в растворе после разделения свидетельствовало о сохранении количества пептидов в процессе хроматографии. Таким образом, все детектируемые при помощи динамического светорассеяния и МУРР ассоциаты пептидов диссоциировали в процессе хроматографии на тетрамеры.

Для моделирования олигомеризации пептидов использовали метод МД в режиме свободной диффузии. Данный метод позволяет получить состояния, которые невозможно моделировать с использованием молекулярного докинга, в том числе неустойчивые олигомеры, существующие только в растворе. В каждый бокс для моделирования поместили по 32 молекулы L или R. Несмотря на то что оба пептида в процессе МД-моделирования показали способность к образованию устойчивой трехмерной динамической сетки в растворе за счет взаимодействия друг с другом, анализ вторичной структуры показал различающиеся результаты (рис. 3). Если для L в большей степени характерны структуры мономеров, характеризующиеся как повороты, то в случае R наблюдалось образование структур, соответствующих межмолекулярным β-листам. По всей видимости, способность образовывать различные виды β-структур является основой для образования различных трехмерных сеток пептидов L и R в растворе.

На рис. 4 представлены модели структур 32-мерных пептидов L и R, полученные в результате МД-моделирования в режиме свободной диффузии.

Таким образом, показано, что пептиды L и R способны к образованию супрамолекулярных комплексов в растворе в модели *in silico*, при этом структуры олигомерных комплексов для этих пептидов существенно различаются.

В [30—32] показано, что некоторые короткие пептиды способны к образованию надмолекулярных структур, в том числе амилоидоподобных фибрилл, в растворе. Тот факт, что короткие пептиды способны образовывать конформационно активные супрамолекулярные комплексы [33] вкупе со способностью коротких пептидов к проникновению через многие клеточные барьеры, открывает вероятность существования новых механизмов регуляции активности белков в норме и





Рис. 3. Карта вторичной структуры для пептидов L (а) и R (б) (T – бета-изгиб, E – бета-структура в составе стопки, В – аминокислотный остаток в отдельном бета-мостике, N – неупорядоченная структура, C – клубок). Каждая прямоугольная секция представляет собой результаты молекулярной динамики одного из 32 пептидов, порядковый номер пептидов указан на оси абсцисс с шагом 5.



Рис. 4. Модели структур 32-мерных пептидов L (а) и R (б). Элементарная периодическая ячейка размером $100 \times 100 \times 100 \times 100$ Å показана в виде куба. В каждой ячейке содержится 32 молекулы пептида L (а) и R (б), представленные комбинацией лент (ribbons) и палочек (sticks). Мономеры окрашены случайным образом в разные цвета, примеры каждого мономера в том же масштабе приведены во врезках на соответствующей части рисунка.

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ том 66 № 5 2021

при патологии и возможность разработки новых биологически активных веществ пептидной природы. Метод МУРР позволяет определять способность пептидов к образованию подобных неустойчивых комплексов, а в сочетании с методом МД-моделирования создавать их модели. Полученные с помощью комбинации указанных методов модели супрамолекулярных пептидных комплексов могут быть использованы как при изучении механизма действия препаратов пептидной природы, так и при изучении механизмов действия природных супрамолекулярных пептидных комплексов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В активной концентрации пептидные индукторы (тетрапептиды GYDT и TDYG) фибриллогенеза пептида, соответствующего по первичной структуре фрагменту бета-домена альфа-лактальбумина человека (GYDTQAIVENNESTEYG), образуют в растворе олигомеры, не выявляемые при помощи аналитической хроматографии и атомно-силовой микроскопии, но детектируемые при помощи методов динамического рассеяния и МУРР. Результаты МД-моделирования тетрапептидов в растворе согласуются с данными МУРР.

Кривые МУРР получены в ESRF, Гренобль, Франция, эксперимент № LS2508 @ID02. Работа выполнена при поддержке НИЦ "Курчатовский институт" (приказ № 1363 от 25.06.2019 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Mangione P.P., Porcari R., Gillmore J.D. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 2014. V. 111. № 4. P. 1539. https://doi.org/10.1073/pnas.1317488111
- 2. Andrews S.J., Rothnagel J.A. // Nat. Rev. Genet. 2014. V. 15. № 3. P. 193.
- https://doi.org/10.1038/nrg3520 3. *Wu H.* // Cell. 2013. V. 153. № 2. P. 287. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.013
- Zabrodskaya Y.A., Lebedev D.V., Egorova M.A. et al. // Biophys. Chem. 2018. V. 234. P. 16. https://doi.org/10.1016/j.bpc.2018.01.001
- Michiels E., Roose K., Gallardo R. et al. // Nat. Commun. 2020. V. 11. № 1. P. 1. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16721-8
- Gallardo R., Ramakers M., De Smet F. et al. // Science. 2016. V. 354. № 6313. P. aah4949. https://doi.org/10.1126/science.aah4949
- Egorov V.V., Solovyov K.V., Grudinina N.A. et al. // Protein Pept. Lett. 2007. V. 14. № 5. P. 471. https://doi.org/10.2174/092986607780782858
- Егоров В.В., Гармай Ю.П., Соловьев К.В. и др. // Докл. РАН. 2007. Т. 414. № 6. С. 828.
- Tuohy V., Jaini R., Johnson J. et al. // Cancers. 2016.
 V. 8. № 6. P. 56. https://doi.org/10.3390/cancers8060056
- 10. Egorov V.V., Lebedev D.V., Shaldzhyan A.A. et al. // Prion. 2014. V. 8. № 5. P. 369. https://doi.org/10.4161/19336896.2014.983745

- 11. Кадочников В.В., Егоров В.В., Швецов А.В. и др. // Кристаллография. 2016. V. 61. № 1. Р. 107. https://doi.org/10.7868/s0023476116010082
- 12. PepCalc.com Peptide calculator. https://pepcalc.com/
- Narayanan T., Sztucki M., Van Vaerenbergh P. et al. // J. Appl. Cryst. 2018. V. 51. № 6. P. 1511. https://doi.org/10.1107/S1600576718012748
- Svergun D.I., Koch M.H.J. // Reports Prog. Phys. 2003.
 V. 66. № 10. P. 1735. https://doi.org/10.1088/0034-4885/66/10/R05
- 15. SasView Small Angle Scattering Analysis. http://www.sasview.org/
- 16. LLC Schrödinger. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.4. 2020. https://pymol.org/2/
- Abraham M.J., Murtola T., Schulz R. et al. // SoftwareX. 2015. V. 1–2. P. 19. https://doi.org/10.1016/J.SOFTX.2015.06.001
- Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K. et al. // J. Chem. Theory Comput. 2015. V. 11. № 8. P. 3696. https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255
- Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D. et al. // J. Chem. Phys. 1983. V. 79. № 2. P. 926. https://doi.org/10.1063/1.445869
- Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F. et al. // J. Chem. Phys. 1984. V. 81. № 8. P. 3684. https://doi.org/10.1063/1.448118
- 21. *Nosé S.* // J. Chem. Phys. 1984. V. 81. № 1. P. 511. https://doi.org/10.1063/1.447334
- 22. *Hoover W.G.* // Phys. Rev. A. 1985. V. 31. № 3. P. 1695. https://doi.org/10.1103/PhysRevA.31.1695
- Martyna G.J., Klein M.L., Tuckerman M. // J. Chem. Phys. 1992. V. 97. № 4. P. 2635. https://doi.org/10.1063/1.463940
- 24. *Martyna G.J., Tuckerman M.E., Tobias D.J., Klein M.L.* // Mol. Phys. 1996. V. 87. № 5. P. 1117. https://doi.org/10.1080/00268979600100761
- Parrinello M., Rahman A. // J. Appl. Phys. 1981. V. 52. № 12. P. 7182.
- https://doi.org/10.1063/1.328693 26. *Nosé S., Klein M.L.* // Mol. Phys. 1983. V. 50. № 5.

P. 1055. https://doi.org/10.1080/00268978300102851

- Shvetsov A.V., Zabrodskaya Y.A., Nekrasov P.A., Egorov V.V. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2018. V. 36. № 10. P. 2694. https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1367329
- Zabrodskaya Y.A., Shvetsov A.V., Tsvetkov V.B., Egorov V.V. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2019. V. 37. № 12. P. 3041.
 - https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1507837
- 29. Sorensen C.M., Cai J., Lu N. // Langmuir. 1992. V. 8. № 8. P. 2064. https://doi.org/10.1021/la00044a029
- 30. *Gazit E.* // Prion. 2007. V. 1. № 1. P. 32. https://doi.org/10.4161/pri.1.1.4095
- Reches M., Porat Y., Gazit E. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 38. P. 35475. https://doi.org/10.1074/jbc.M206039200
- 32. *Haspel N., Zanuy D., Ma B. et al.* // J. Mol. Biol. 2005. V. 345. № 5. P. 1213.
- https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.11.002
- 33. *Zhou J., Du X., Xu B.* // Prion. 2015. V. 9. № 2. P. 110. https://doi.org/10.1080/19336896.2015.1022021

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ том 66 № 5 2021