

01

Математическое моделирование линейного докинга. II. Определение влияния точечных мутаций на сродство между белковыми молекулами

© Т.В. Кошлан,¹ К.Г. Куликов²

¹ Санкт-Петербургский государственный университет,
199034 Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: kulikov.kirill.g@gmail.com

(Поступило в Редакцию 29 ноября 2017 г.)

Представлен новый метод, который позволяет качественно определять константу диссоциации пептидов к полноразмерным белкам, а также устанавливать влияние точечных мутаций в пептидах на устойчивость образованного комплекса с целыми белками. На основе разработанного подхода была выявлена качественная корреляция полученных результатов с константой диссоциации на примере образования биологического комплекса ВНЗ-пептидов белков Bmf, Puma, Bad, Hrk, Вах, Bik, Noxa, Bid, Vim, Vak с белком Bcl-xl и ВНЗ-пептидов белка Вах, с учетом замен аминокислотных остатков, с белком Bcl-2.

DOI: 10.21883/JTF.2018.08.46302.2574

Введение

Работа посвящена исследованию взаимодействия ВНЗ-пептидов с антиапоптозными белками семейства Bcl-2, которые являются регуляторами путей митохондриального апоптоза. Отметим, что нарушения в процессе апоптоза являются признаком большого количества заболеваний, таких как рак, саркомы, карциномы, лимфомы, лейкозы.

Результаты исследований [1] свидетельствуют о том, что пептиды обладают выраженным защитным действием при различных заболеваниях и оказывают модулирующее влияние на различные системы организма. В отличие от химиопрепаратов пептиды являются селективными и эффективными сигнальными молекулами, которые связываются с определенными рецепторами или ионными каналами, где они вызывают внутриклеточные эффекты. Поскольку пептиды отличаются высокой селективностью и эффективностью и в то же время характеризуются относительно безопасной и хорошей переносимостью, они представляют собой отличную отправную точку для разработки новых терапевтических средств, а их специфичность демонстрирует прекрасные профили безопасности, переносимости и эффективности у людей с различной патологией.

Мы полагаем, что дальнейшее развитие пептидных лекарств будет основываться на применении компьютерного и математического дизайна для нахождения оптимальных пептидов с учетом сродства к их мишеням, а также для улучшения их химических и физических свойств.

В данной статье будет определено влияние точечных мутаций в ВНЗ-пептидах на стабильность образованного ими биологического комплекса с проапоптотическими бел-

ками семейства Bcl-2, а также качественное определение константы диссоциации при связывании различных ВНЗ-пептидов с белками Bcl-2 и Bcl-xl.

Рассмотрим некоторые из работ, посвященные семейству белков Bcl-2, а также изучению аффинности ВНЗ-пептидов к белкам семейства Bcl-2. В [2] рассматриваются последние достижения в понимании того, как белки семейства Bcl-2 контролируют пермеабиллизацию наружной мембраны митохондрий посредством различных взаимодействий между белками данного семейства.

Так в [3] было установлено, что белок Bcl-2 связывается с белком Вах через два взаимозависимых интерфейса, что приводит к ингибированию проапоптотической олигомеризации Вах. Исследования различных интерфейсов с большим количеством задействованных аминокислотных остатков вносят дополнительную ясность в характер взаимодействия белков семейства Bcl-2.

В [4] исследовалась молекулярная основа специфичности связывания проапоптотических ВНЗ-пептидов, которые содержат различные мотивы, с проапоптотическим белком Bcl-xl. Были выявлены различные мотивы в ВНЗ-доменах белков, которые влияли на аффинность связывания с белком Bcl-xl.

В нашей работе, в отличие от вышеперечисленных, предлагается математическая модель определения сродства различных ВНЗ-пептидов к белкам семейства Bcl-2, а также учет влияния точечных мутаций в пептидах на устойчивость сформированного ими биологического комплекса.

Первая часть статьи содержит информацию о структуре и функциях исследуемых белков семейства Bcl-2. Вторая часть посвящена численному расчету взаимодействия пептидов белков семейства Bcl-2, содержащих ВНЗ-участок, с белком Bcl-xl. В данной части проведен

анализ и обработка полученных численных расчетов взаимодействия пептидов белков Bmf, Puma, Bad, Hrk, Вах, Bik, Noxa, Bid, Vim, Вак с белком Bcl-xl, проведено качественное сравнение полученных расчетов с константой диссоциации (Kd), выполнен дополнительный расчет взаимодействия коротких ВН3-пептидов, в которых были выполнены замены аминокислотных остатков, с белком Bcl-xl, а также исследовано влияние точечных мутаций в ВН3-пептидах белка Вах на стабильность образованных ими биологических комплексов с белком Bcl-2 и выполнен численный расчет связывания пептидов белков Vim и Bid с белком Bcl-2.

Аминокислотные последовательности ВН3-пептидов были взяты из [4,5]. Аминокислотные последовательности белков Bcl-xl₍₁₋₂₀₀₎ и Bcl-2 были взяты из базы данных [6], с номерами Q07817 и P10415 соответственно. Последовательность Bcl-xl₍₁₋₂₀₀₎ далее по тексту будет записываться как Bcl-xl. Аминокислотные последовательности ВН3-пептидов Vim₍₁₃₆₋₁₇₁₎ и Bid₍₇₆₋₁₁₁₎ были взяты из базы данных [6] с номерами O43521 и P55957 соответственно.

1. Структура и функции белков семейства Bcl-2

Белки семейства В-клеточной лимфомы-2 (Bcl-2) контролируют собственный апоптотический путь, регулируя процесс пермеабиллизации наружной мембраны митохондрий через белок-белковые взаимодействия.

Структурные и биохимические исследования показали двойную роль антиапоптотических белков семейства Bcl-2 в ингибировании белков ВН3-only и в сдерживании активированных белков Вах, Вак. Подробно взаимодействия между белками семейства Bcl-2 представлено в [2].

Белки семейства Bcl-2 можно разделить на 3 группы на основании их структуры и внутриклеточных функций:

1) проапоптотические белки Вах и Вак, которые известны как эффекторы апоптоза.

Данная группа белков содержит 3 домена ВН1–ВН3 и может непосредственно пермеабиллизировать наружную мембрану митохондрий при активации.

Мономер Вах представляет собой глобулярную структуру с образованием гидрофобной канавки, образованную α 3-, α 4-, α 5-спиралями. При этом участок С-конца белка, α 9-спираль, занимает эту гидрофобную канавку. В отличие от белка Вах гидрофобная канавка белка Вак пуста. Обычно Вак находится в связанном состоянии с цитоплазматической поверхностью наружной мембраны митохондрий через С-концевой гидрофобный ТМ домен в отличие от Вах, который находится в цитозоле. В результате структурных различий предполагается, что механизмы активации Вах и Вак различны.

Активация Вах инициируется путем связывания активирующих лигандов с N-концевым доменом. Это приводит к конформационным изменениям, которые влекут за

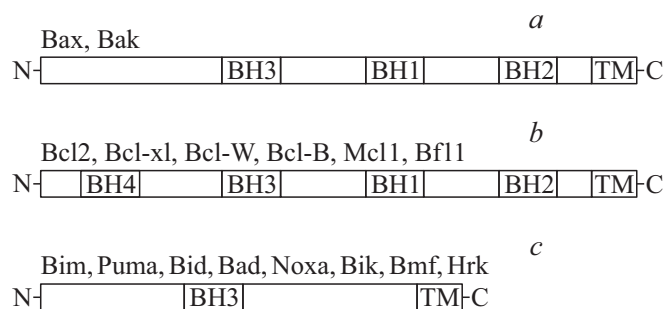


Рис. 1. Схема белков семейства Bcl-2.

собой высвобождение α 9-спирали из гидрофобной канавки, что способствует транслокации Вах из цитоплазмы на поверхность митохондрий. Помимо этого, происходит дополнительная активация путем связывания лигандов с освобожденной гидрофобной канавкой. Активация Вак инициируется доменом ВН3, который связывается с гидрофобной канавкой. Схема структуры белков семейства Bcl-2 приведена на рис. 1.

2) антиапоптотические белки (репрессоры): Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bcl-B, Mcl1, A1, Bfl1. Эти белки содержат все 4 консервативные гомологичные области домена ВН1–ВН4. С-конец содержит гидрофобный домен ТМ и отвечает за связывание этих белков с внутриклеточной мембраной, в частности с наружной мембраной митохондрий. Антиапоптотические белки ингибируют апоптоз путем связывания проапоптотических ВН3-only белков и белков эффекторов Вак и Вах, тем самым предотвращая пермеабиллизацию наружной мембраны митохондрий. Способность антиапоптотических белков Bcl-2 связываться с различными проапоптотическими белками семейства Bcl-2 варьируется.

Так, белки Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w связываются почти со всеми апоптотическими белками более эффективно, чем Bcl-B, Mcl1, Bfl1. Антиапоптотические белки обладают индивидуальной сходной глобулярной структурой, содержащей „ядро Bcl-2“. Это ядро состоит из восьми α -спиралей, которые образуют гидрофобную канавку, фланкированную доменами ВН1 и ВН3. Эта гидрофобная канавка имеет решающее значение для биологии антиапоптотических белков семейства Bcl-2, поскольку она обеспечивает интерфейс для взаимодействия ВН3 доменов ВН3-only белков и антиапоптотических эффекторов Вак и Вах.

На основании структуры гидрофобной канавки были разработаны различные имитаторы области ВН3, которые могут занять эту канавку и, таким образом, инактивировать антиапоптотические функции этих белков.

3) третья группа белков: ВН3-only белки (активаторы). Эту группу составляют белки: Vim, Puma, Bid, Bad, Noxa, Bik, Bmf, Hrk. Эти белки содержат только 15–25 остатков ВН3-домена, однако наличие этого домена играет решающую роль для взаимодействия этих белков с другими белками семейства Bcl-2 при

регулировании пермеабилзации наружной мембраны митохондрии.

Важной ролью белков группы ВН3-only является передача различных сигналов для инициирования пермеабилзации наружной мембраны митохондрий. Белки ВН3-only активируются различными цитотоксическими стимулами.

Данную группу белков можно разделить на прямые активаторы и сенсibilизаторы. По мере получения проапоптических сигналов, например повреждение ДНК, клеточный стресс, такие белки как Bid или Bad стимулируют и конкурируют с эффекторами за связывание с репрессорами и при этом не только нейтрализуют антиапоптические действия репрессоров, но и приводят к проапоптическому действию эффекторов.

Эффекторы впоследствии иницируют апоптозную гибель клеток по их способности встраиваться в наружную мембрану митохондрий, что служит причиной образования пор в мембранах. Это приводит к освобождению апоптогенных факторов, таких как цитохром с и Smac/Diablo из митохондрий в цитозоль [7].

Таким образом, согласованное действие различных белков Bcl-2 позволяет держать под контролем апоптоз в здоровой клетке, в то время как нарушение в регуляции ведет к серьезным патологическим последствиям.

Образование гетеродимеров между различными белками семейства Bcl-2 определяет, выживет клетка или нет [4]. Семейство Bcl-2 является важной терапевтической целью из-за чрезмерной экспрессии в раковых клетках, где данные белки вносят вклад в онкогенез и устойчивость к химиотерапии.

В частности, сверхэкспрессия белка Bcl-x1 и Bcl-2 репрессоров апоптоза связана с развитием различных онкологических заболеваний. Белки Bcl-x1 и Bcl-2 являются наиболее подходящими мишенями для противораковой терапии.

Таким образом, в настоящей работе будут исследованы взаимодействия различных ВН3-пептидов с антиапоптическими белками Bcl-x1, Bcl-2.

2. Результаты численных расчетов

В этой части работы приведены результаты численных расчетов взаимодействия ВН3-пептидов с белком Bcl-x1, а также выполнен анализ влияния точечных мутаций в ВН3-пептидах на их способность образовывать стабильные биологические комплексы с проапоптическим белком Bcl-x1.

2.1. Результаты численного моделирования взаимодействия ВН3-пептидов белков Bmf, Puma, Bad, Hrk, Bax, Bik, Noxa, Bid, Bim, Bak с белком Bcl-x1

В настоящем разделе исследовано взаимодействие коротких ВН3-пептидов белков Bmf, Puma, Bad, Hrk, Bax, Bik, Noxa, Bid, Bim, Bak с белком Bcl-x1.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности ВН3-пептидов

№	Наименование белка	Аминокислотная последовательность
1	Bmf	QAEVQIARKLQCIADQFHRL
2	Puma	QWAREIGAQLRRMADDLNAQ
3	Bad	WAAQRYGRELRRMSDEFVDS
4	Hrk	SAAQLTAARKALGDELHQR
5	Bax	ASTKKLSESLKRIGDELDSN
6	Bik	EGSDALALRLACIGDEMDVS
7	Noxa	ELEVECATQLRRFGDKLNFR
8	Bid	DIIRNIARHLAQVGDSDMDRS
9	Bim	RPEIWIAQELRRIGDEFNAY
10	Bak	STMGQVGRQLAIGDDINRR

Таблица 2. Группы ВН3-пептидов по степени сродства к белку Bcl-x1

Группа	ВН3-пептиды	Kd, μmol
I	Hrk, Bax, Bik, Noxa	4.69–26.01
II	Bmf, Puma, Bad, Bid, Bim, Bak	0.2–0.65

Каждый из этих пептидов имеет свою аффинность к белку Bcl-x1, поскольку каждый пептид обладает своей уникальной аминокислотной последовательностью.

В рассматриваемой работе мы сравнили аффинности участвующих в исследовании пептидов при их поочередном взаимодействии с белком Bcl-x1 согласно ранее разработанному нами алгоритму 1.

Отметим, что ВН3-пептиды принимают конформацию α -спирали и связываются с $\alpha 2$ – $\alpha 5$ -спиралями белка Bcl-x1. Данное взаимодействие стабилизируется через большое количество внутримолекулярных контактов.

Согласно ранее проведенным исследованиям [4], перечисленные выше короткие пептиды по сродству с полноразмерным белком Bcl-x1 можно разделить на 2 группы.

В первую группу (I) вошли ВН3-пептиды (Hrk, Bax, Bik, Noxa) с более высоким значением константы диссоциации к Bcl-x1, а вторую группу (II) (Bmf, Puma, Bad, Bid, Bim, Bak) составили ВН3-пептиды, характеризующиеся меньшим значением Kd к белку Bcl-x1. Перечень аминокислотных последовательностей приведен в табл. 1.

Константы диссоциации (Kd) для каждой группы пептидов при взаимодействии с Bcl-x1 приведены в табл. 2 согласно [4].

Как мы видим из приведенной табл. 2, группу I составляют ВН3-пептиды с более низким уровнем аффинности к Bcl-x1, Kd которых варьируется от 4.69 до 26.01 μmol . Группу II составили ВН3-пептиды с более высоким уровнем аффинности, Kd менялась в пределах от 0.2 до 0.65 μmol .

При осуществлении численного расчета взаимодействия каждого ВНЗ содержащего пептида с Vcl-x1 использовался алгоритм 1. По мере продвижения короткого ВНЗ-пептида вдоль длинного белка Vcl-x1 мы получали значение величины $\lg(\text{cond}(W))$ для каждого шага сдвига вдоль длинного белка Vcl-x1.

На рис. 2 приведен график полученного численного расчета для всех десяти ВНЗ-пептидов при взаимодействии с белком Vcl-x1.

Для анализа полученных данных мы разбили область наименьших значений величин $\lg(\text{cond}(W))$ на несколько градаций, начиная со значения 17.8. При этом мы считаем, что наиболее стабильный биологический комплекс характеризуется наименьшим значением величины $\lg(\text{cond}(W))$.

На рис. 3 представлены области наименьших значений величины $\lg(\text{cond}(W))$, полученных при взаимодействии 10 коротких пептидов с белком Vcl-x1. Участок наименьших значений представлен пятью областями: I, II, III, IV, V, и при этом каждая последующая область включает в себя предыдущую. Таким образом, область I находится в интервале значений величины $\lg(\text{cond}(W))$ 17.8–17.9; II область — 17.8–18.0; III область — 17.8–18.1; IV область — 17.8–18.2; V — 17.8–18.3. За 100% мы принимаем общее количество точек, которые попали в каждую рассматриваемую конкретную область: I, II, III, IV, V. Процентное содержание значений для каждой группы пептидов для различных областей сведены в табл. 3.

Как мы видим из приведенной табл. 3, области с наименьшими значениями величин $\lg(\text{cond}(W))$ (I–III обла-

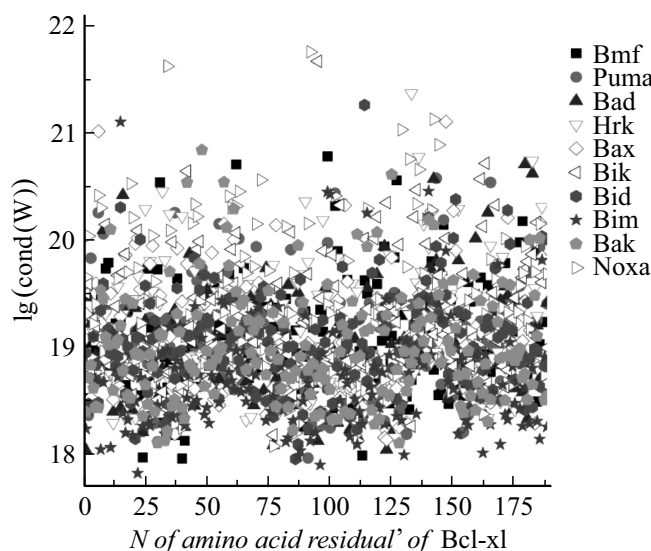


Рис. 2. Результаты численного расчета взаимодействия ВНЗ-пептидов белков Bmf, Puma, Bad, Hrk, Bax, Bik, Noxa, Bid, Vim, Bak с белком Vcl-x1. Закрашенные фигуры обозначают результаты, полученные при взаимодействии ВНЗ-пептидов II группы с Vcl-x1; незакрашенные фигуры обозначают результаты, полученные при взаимодействии ВНЗ-пептидов I группы с Vcl-x1.

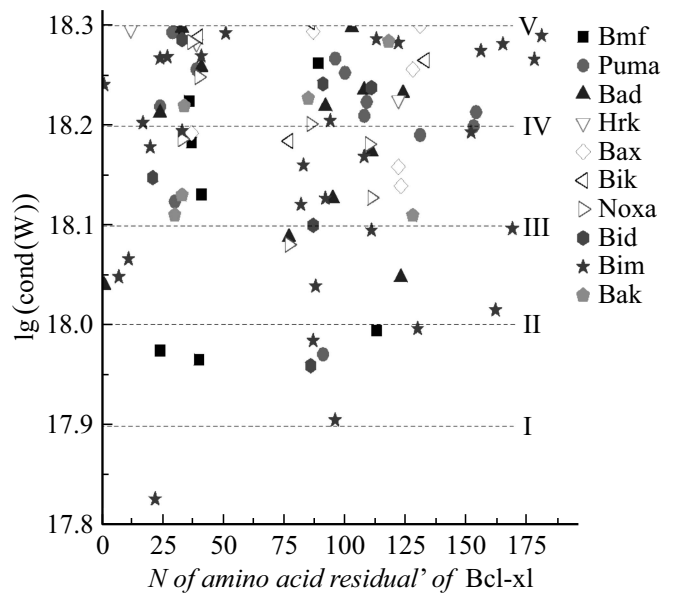


Рис. 3. Результаты численного расчета взаимодействия ВНЗ-пептидов белков Bmf, Puma, Bad, Hrk, Bax, Bik, Noxa, Bid, Vim, Bak с белком Vcl-x1 в области наименьших значений величины $\lg(\text{cond}(W))$. Закрашенные фигуры обозначают результаты, полученные при взаимодействии ВНЗ-пептидов II группы с Vcl-x1; незакрашенные фигуры обозначают результаты, полученные при взаимодействии ВНЗ-пептидов I группы с Vcl-x1.

Таблица 3. Процентное содержание значений величины $\lg(\text{cond}(W))$ для каждой группы ВНЗ-пептидов при взаимодействии с Vcl-x1 в соответствии с каждой областью

Область, %	Диапазон	I Hrk, Bax, Bik, Noxa	II Bmf, Puma, Bad, Bid, Vim, Bak
I	17.8–17.9	0.0	100.0
II	17.8–18.0	0.0	100.0
III	17.8–18.1	5.5	94.5
IV	17.8–18.2	11.1	89.9
V	17.8–18.3	23.1	76.9

сти) представлены большинством значений, полученных для пептидов II группы, которые характеризуются высокой афинностью к белку Vcl-x1. Так, области I и II содержат 100% полученных значений при взаимодействии ВНЗ-пептидов группы II с белком Vcl-x1. Область III содержит 5.5% значений величин $\lg(\text{cond}(W))$, полученных при взаимодействии ВНЗ-пептидов I группы с белком Vcl-x1 и 94.5% значений величины $\lg(\text{cond}(W))$, полученных при взаимодействии ВНЗ-пептидов II группы с белком Vcl-x1. Области, содержащие более высокие значения величины $\lg(\text{cond}(W))$ (IV и V области), содержат 11.1 и 23.1% значений величины $\lg(\text{cond}(W))$, полученных при взаимодействии пептидов I группы с белком Vcl-x1 и 89.9 и 76.9% значений величины $\lg(\text{cond}(W))$

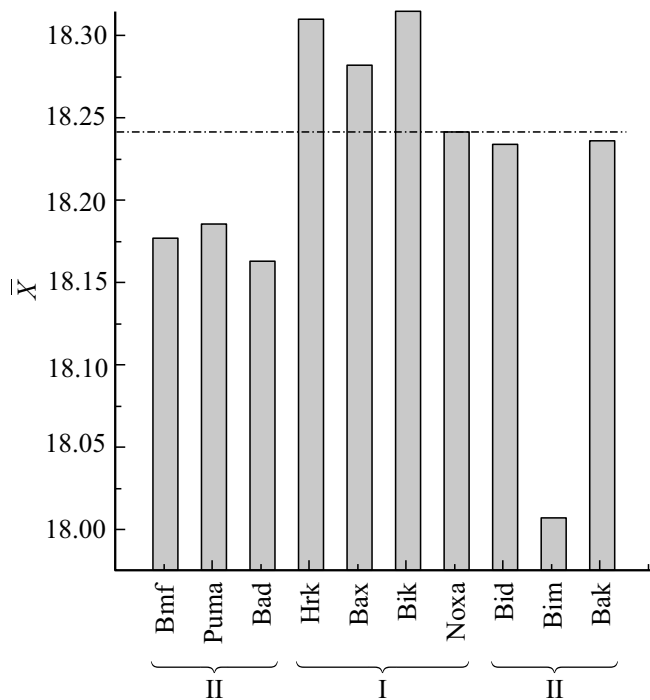


Рис. 4. Значение величины \bar{X} , полученное при взаимодействии каждого ВНЗ-пептида белка Bmf, Puma, Bad, Hrk, Vax, Bik, Noxa, Bid, Vim, Bak с белком Bcl-x1.

при взаимодействии ВНЗ-пептидов группы II с белком Bcl-x1 соответственно.

Таким образом, мы приходим к выводу, что значения $\lg(\text{cond}(W))$ находятся на более высоких значениях для I группы ВНЗ-пептидов, а для ВНЗ-пептидов II группы — на более низких значениях, что говорит о более высокой аффинности ВНЗ-пептидов группы II к белку Bcl-x1, чем ВНЗ-пептидов группы I к белку Bcl-x1.

Для проверки данного предположения мы вычислили среднюю величину (\bar{X}) для десяти минимальных значений $\lg(\text{cond}(W))$ для каждого ВНЗ-пептида при взаимодействии с белком Bcl-x1 и представили графически полученные значения для каждого взаимодействующего ВНЗ-пептида с белком Bcl-x1 (рис. 4).

Как видно из представленной гистограммы, четыре максимальных значения величины \bar{X} принадлежат I группе ВНЗ-пептидов белков (Hrk, Vax, Bik, Noxa) со значениями 18.311, 18.282, 18.314, 18.242 соответственно. Вторая группа ВНЗ-пептидов (Bmf, Puma, Bad, Bid, Vim, Bak) имеет более низкие значения величины \bar{X} : 18.178, 18.186, 18.163, 18.236, 18.007, 18.238 соответственно, что подтверждает ранее приведенный вывод.

Итак, в представленном разделе проведен качественный анализ определения сродства коротких ВНЗ-пептидов белков Bmf, Puma, Bad, Hrk, Vax, Bik, Noxa, Bid, Vim, Bak с белком Bcl-x1 и выявлено качественное согласие с [4].

2.2. Результаты численных расчетов взаимодействия ВНЗ-пептидов белков mHrk и mBik, в которых были выполнены замены аминокислотных остатков, с белком Bcl-x1

В данном разделе было исследовано влияние точечных мутаций в коротких ВНЗ-пептидах Hrk и Bik на связывание с белком Bcl-x1. Пептиды, в которых будут выполнены замены аминокислотных остатков, мы будем записывать с буквой „m“.

Запишем аминокислотные последовательности пептидов с учетом выполненных замен аминокислотных остатков:

mBik
[EGSDALARRLACIGDEMDVS],
mHrk
[SAAQLTAQRLKALGDELHQR].

В данных ВНЗ-пептидах были выполнены замены аминокислотных остатков, которые могут существенно влиять на связывание с белком Bcl-x1. Как было установлено в [4], замена данных аминокислотных остатков привела к существенному уменьшению константы диссоциации. Так, для пептида Bik константа диссоциации уменьшилась с 17.49 до 2.11 μmol при замене аминокислотного остатка, для пептида HRK константа диссоциации уменьшалась с 4.69 до 0.78 μmol .

Мы решили проверить, сможет ли наш расчет взаимодействия пептидов mBik и mHrk с полноразмерным белком Bcl-x1 выявить качественные изменения с константой диссоциации.

Результаты расчета взаимодействия mBik с белком Bcl-x1, а также результаты, полученные при взаимодей-

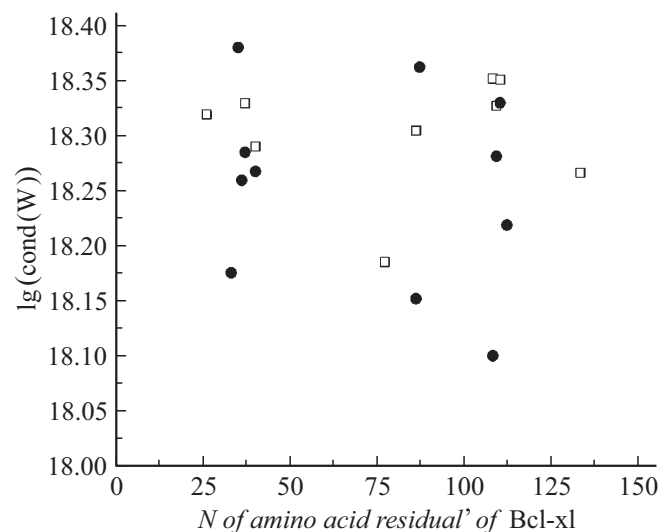


Рис. 5. Результаты численного расчета взаимодействия ВНЗ-пептидов белков Hrk и mHrk с белком Bcl-x1. Закрашенные фигуры обозначают результаты, полученные при взаимодействии ВНЗ-пептида mHrk с Bcl-x1; незакрашенные фигуры обозначают результаты, полученные при взаимодействии ВНЗ-пептида Hrk с Bcl-x1.

Таблица 4. Перечень аминокислотных последовательностей ВНЗ-пептидов белка Вах с указанием аминокислотных замен и константы диссоциации для каждого пептида при взаимодействии с белком Vcl-2

Расположение точечных мутаций в области белка Вах _(49–84)	Аминокислотная последовательность	Kd, μmol
Вах _(49–84)	QPPQDASTKKLSECLRRIGDELDSNMELQRMIAVD	15.1
mВах _(61A,R64A,R78A)	QPPQDASTKKLSACLARIGDELDSNMELQAMIADVD	95.2
mВах _(E61A)	QPPQDASTKKLSACLRRIGDELDSNMELQRMIAVD	129
mВах _(R64A)	QPPQDASTKKLSECLARIGDELDSNMELQRMIAVD	1040
mВах _(D68A)	QPPQDASTKKLSECLRRIGAELDSNMELQRMIAVD	476
mВах _(E69A)	QPPQDASTKKLSECLRRIGDALDSNMELQRMIAVD	57.1
mВах _(R78A)	QPPQDASTKKLSECLRRIGDELDSNMELQAMIADVD	787

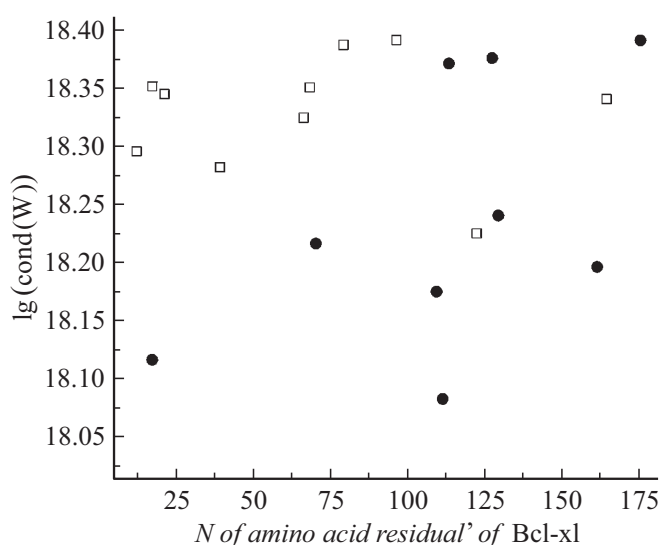


Рис. 6. Результаты численного расчета взаимодействия ВНЗ-пептидов белков Bik и mBik с белком Vcl-x1. Закрашенные фигуры обозначают результаты, полученные при взаимодействии ВНЗ-пептида mBik с Vcl-x1; незакрашенные фигуры обозначают результаты, полученные при взаимодействии ВНЗ-пептида Bik с Vcl-x1.

ствии Bik с белком Vcl-x1 для сравнения, представлены на рис. 5 и результаты расчета взаимодействия mHRK с белком Vcl-x1, а также результаты, полученные при взаимодействии HRK с белком Vcl-x1 для сравнения, представлены на рис. 6.

Как мы видим из приведенных графиков, значения величин $\lg(\text{cond}(W))$ для пептидов, в которых были выполнены замены аминокислотных остатков mBik и mHrk при их взаимодействии с Vcl-x1, лежат в более низком диапазоне значений, чем значения величин $\lg(\text{cond}(W))$, полученные для пептидов Hrk и Bik при их взаимодействии с белком Vcl-x1. Также на представленных графиках мы видим влияние замен аминокислотных остатков на образование более стабильного биологического комплекса.

Также мы подсчитали среднее значение десяти минимальных значений $\lg(\text{cond}(W))$, полученных при взаимодействии mBik с белком Vcl-x1 и mHrk с белком Vcl-x1. Полученные результаты представлены на гистограмме (рис. 7).

Как видно из представленной гистограммы, значения величины (\bar{X}) , полученные при взаимодействии ВНЗ-пептидов mBik и mHrk с белком Vcl-x1, находятся в более низкой области значений, чем для Bik и Hrk при взаимодействии с белком Vcl-x1. Значения величины (\bar{X}) при взаимодействии пептидов mBik и mHrk с белком Vcl-x1 составили 18.242, 18.259 соответственно. Значения величины (\bar{X}) при взаимодействии пептидов Bik и Hrk с белком Vcl-x1 составили 18.314, 18.330 соответственно.

Таким образом, разработанный нами метод позволяет учитывать влияние точечных мутаций, а именно замены ключевых аминокислотных остатков в пептидах на их способность образовывать устойчивые биологические комплексы с белком Vcl-x1.

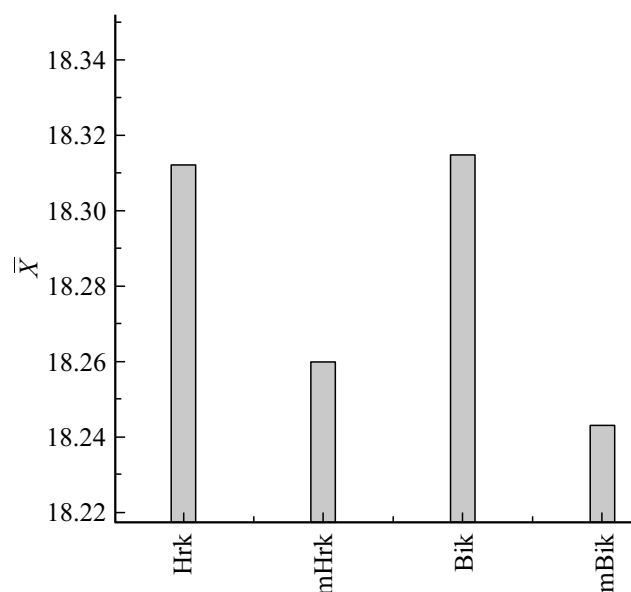


Рис. 7. Значение величины \bar{X} , полученное при взаимодействии ВНЗ-пептидов белков Hrk, mHrk, Bik, mBik с Vcl-x1.

2.3. Взаимодействие ВНЗ-пептидов белка Вах с учетом замены аминокислотных остатков, с белком Vcl-2

В этом разделе проведено численное моделирование связывания ВНЗ-пептидов белка Вах, с учетом различных замен аминокислотных остатков (далее а.а.), с белком Vcl-2. Полученный результат позволит определять влияние точечных мутаций в ВНЗ-пептидах белка Вах на устойчивость образованных комплексов с белком Vcl-2.

В [5] была определена структура связывания белка Vcl-2 с участком белка Вах. Пептид белка Вах формирует амфифильную α -спираль и связывается с ВНЗ-связывающей гидрофобной канавкой белка Vcl-2. Внутримолекулярное взаимодействие между белком Vcl-2 и пептидом белка Вах осуществляется гидрофобными и ионными взаимодействиями. Одними из основных аминокислотных остатков со стороны белка Vcl-2 являются аминокислотные остатки в области с 107 а.а. по 146 а.а., а также аминокислотный остаток в области 200 а.а. Аминокислотные последовательности ВНЗ-пептида белка Вах с выполненными заменами аминокислотных остатков, а также константы диссоциации при связывании каждого пептида с белком Vcl-2 приведены в табл. 4.

Для дальнейшего анализа полученных данных мы разбили область наименьших значений величины $\lg(\text{cond}(W))$ на 5 областей, причем каждая последующая область включает в себя предыдущую, и подсчитали количество попавших в каждую область значений величин $\lg(\text{cond}(W))$ для каждой пары взаимодействий ВНЗ-пептида с Vcl-2 белком. При этом за 100% мы принимаем общее количество точек, которые попали в каждую рассматриваемую конкретную область: I, II, III, IV, V.

Так I категория лежит в области значений $\lg(\text{cond}(W))$ от 18.6 до 18.7; II категория — от 18.6 до 18.8; III категория — от 18.6 до 18.9; IV категория — от 18.6 до 19.0; V категория от 18.6 до 19.1.

На рис. 8 представлены численные результаты взаимодействия ВНЗ-пептидов белка Вах с белком Vcl-2 согласно разбиению области наименьших значений величины $\lg(\text{cond}(W))$ на 5 категорий, а также процентное содержание величины $\lg(\text{cond}(W))$ для каждого ВНЗ-пептида при взаимодействии с белком Vcl-2 с учетом пяти областей, которые сведены в табл. 5.

Как мы видим из приведенной таблицы, взаимодействие ВНЗ-пептида Вах_(49–85) с белком Vcl-2 характеризуется высоким процентным содержанием величин $\lg(\text{cond}(W))$ в областях II–III по сравнению с остальными ВНЗ-пептидами белка Вах, в которых были выполнены замены аминокислотных остатков. В областях более высоких значений величины $\lg(\text{cond}(W))$ IV и V, как видно из таблицы, отсутствуют явные корреляции преобладания каких-либо тенденций для ВНЗ-пептидов с учетом особенностей их аминокислотных последовательностей и констант диссоциации из табл. 4.

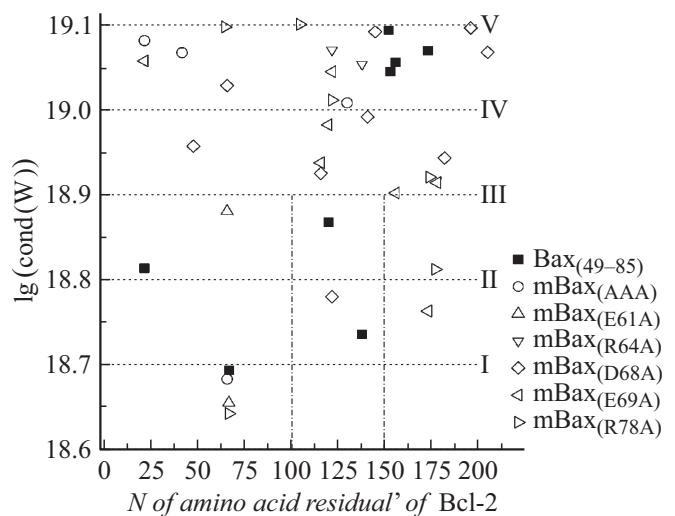


Рис. 8. Результаты численного расчета взаимодействия ВНЗ-пептидов белка Вах с белком Vcl-2 (закрашенные фигуры) и ВНЗ-пептидов белка Вах, в которых были выполнены замены аминокислотных остатков (незакрашенные фигуры), с белком Vcl-2 в области наименьших значений величины $\lg(\text{cond}(W))$.

Таблица 5. Процентное содержание значений для каждой группы ВНЗ-пептидов при взаимодействии с белком Vcl-2 в соответствии с каждой областью значений $\lg(\text{cond}(W))$

Наименование пептида	I, %	II, %	III, %	IV, %	V, %
Vaxwt	25	28.6	36	20	21
mVax _(61A,R64A,R78A)	25	14.28	10	5	10.5
mVax _(E61A)	25	14.28	18	10	5.25
mVax _(R64A)	0	0	0	0	8
mVax _(D68A)	0	14.28	9	25	23.7
mVax _(E69A)	0	14.28	9	25	18.4
mVax _(R78A)	25	14.28	18	15	13.15

Также мы вычислили среднее значение (\bar{X}) десяти минимальных величин $\lg(\text{cond}(W))$ для каждого взаимодействия ВНЗ-пептида с белком Vcl-2. Полученные результаты представлены на рис. 9.

Как видно из представленной гистограммы, наименьшее значение (\bar{X}) отвечает взаимодействию ВНЗ-пептида Вах_(49–85) с белком Vcl-2. Отметим, что данное взаимодействие характеризуется наименьшим значением Kd по сравнению с остальными взаимодействиями ВНЗ-пептидов, в которых были выполнены точечные замены аминокислотных остатков с белком Vcl-2: mVax_(61A,R64A,R78A), mVax_(E61A), mVax_(R64A), mVax_(D68A), mVax_(E69A), mVax_(R78A).

Также отдельного внимания заслуживает область белка Vcl-2, в которой, согласно [5], происходит наиболее интенсивное участие аминокислотных остатков в связывании с ВНЗ-пептидом Вах_(49–85). Эта область с 107 а.а. по 146 а.а.

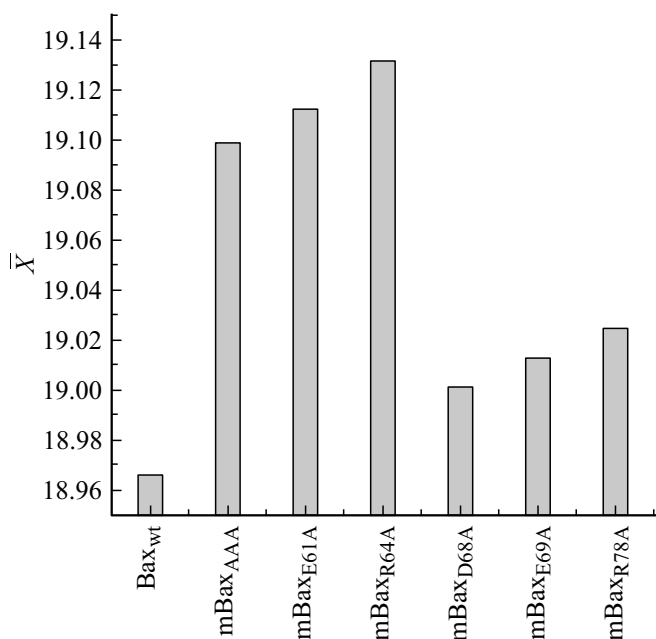


Рис. 9. Значение величины \bar{X} , полученное при взаимодействии Vh3-пептидов белка Vax с белком Vcl-2.

Как следует из рис. 8, лишь два значения величины $\lg(\text{cond}(W))$ присутствуют в областях I–III с малыми значениями величины $\lg(\text{cond}(W))$, которые отвечают взаимодействию Vh3-пептида Vax_(49–85) с белком Vcl-2, а также одно значение, отвечающее взаимодействию Vh3-пептида mVax_(D68A) с белком Vcl-2. Мы предполагаем, что можно анализировать отдельные участки аминокислотных последовательностей целых белков при их связывании с пептидами, в которых выполнены замены аминокислотных остатков, если заранее известен участок взаимодействия для пептидов дикого типа с исследуемым белком.

Мы принимаем взаимодействие Vh3-пептида белка Vax_(49–85) с белком Vcl-2 за эталонное взаимодействие, относительно которого мы будем проводить анализ ухудшения или улучшения взаимодействия коротких Vh3-пептидов, в которых будут выполняться замены аминокислотных остатков. Согласно данному предположению, все 6 Vh3-пептидов белка Vax_(49–85), в которых были выполнены замены аминокислотных остатков, связываются с белком Vcl-2 хуже, поскольку в заданном интервале полипептидной последовательности белка Vcl-2 (107 а.а.–146 а.а.) присутствует только два значения величины $\lg(\text{cond}(W))$, полученные при взаимодействии Vh3-пептида Vax_(49–84) с белком Vcl-2. Значения величин $\lg(\text{cond}(W))$ для всех остальных взаимодействий Vh3-пептидов с белком Vcl-2 не попали в заданный интервал, кроме mVax_(D68A)–Vcl-2.

Таким образом, участок Vax_(49–85) склонен образовывать наиболее стабильные биологические комплексы с белком Vcl-2 по сравнению со всеми остальными участками белка Vax_(49–85), в которых были заменены

Таблица 6. Перечень констант диссоциации (Kd) и параметра (\bar{X}) при взаимодействии Vh3-пептидов Vim_(136–171), Vax_(49–85) и Bid_(76–111) с белком Vcl-2

№	Короткий пептид	Kd, μmol	\bar{X}
1	Vim _(136–171)	2.44	18.534
2	Bid _(76–111)	4.57	18.757
3	Vax _(49–85)	15.1	18.966

одна или несколько аминокислотных остатков на аминокислотный остаток аланина (A). Данный результат находится в хорошем согласии с ранее выполненной экспериментальной работой, в которой указывается, что константа диссоциации мутантных пептидов при связывании с белком Vcl-2 выше, чем при связывании с природным участком Vax_(49–85) [5].

2.4. Взаимодействие коротких пептидов белков Vim и Bid с антиапоптотическими белками семейства Vcl-2: Vcl-2, Vcl-x1

В данном разделе был проведен численный анализ взаимодействия Vh3-пептидов белков Vim_(136–171) и Bid_(76–111) с белком Vcl-2.

Отметим, что рассмотренное взаимодействие характеризуется меньшей величиной константы диссоциации Kd по сравнению со взаимодействием Vh3-пептида Vax_(wt) с белком Vcl-2 (табл. 6). Так, взаимодействие Vh3-пептида Vax_(49–84) с белком Vcl-2 характеризуется константой диссоциации 15.1 μmol , а взаимодействие Vh3-пептидов белков Vim_(136–171) и Bid_(76–111) характеризуется константой диссоциации 2.44 и 4.57 μmol соответственно [5].

Ниже приведен график сравнения результатов численного моделирования взаимодействия Vh3-пептида Vim_(136–171) и Vax_(49–85) с Vcl-2 (рис. 10). Как мы видим из представленного графика, результаты значений величины $\lg(\text{cond}(W))$, полученные при взаимодействии Vim_(136–171)–Vcl-2, находятся в диапазоне более низких значений, чем значения величины $\lg(\text{cond}(W))$, полученные при взаимодействии Vax_(49–85)–Vcl-2, что говорит о более стабильном формировании биологического комплекса, образованного аминокислотными последовательностями Vim_(136–171) и Vcl-2, чем Vax_(49–85) и Vcl-2.

Полученные результаты находятся в хорошем качественном согласии с ранее выполненной экспериментальной работой [5], в которой указывается, что константа диссоциации (Kd) для соединения Vim_(136–171)–Vcl-2 примерно на порядок меньше, чем Kd для соединения Vax_(49–85)–Vcl-2.

Перейдем к результатам численных расчетов взаимодействия Vh3-пептида белка Bid_(76–111) с белком Vcl-2. Численный расчет взаимодействия между выбранными аминокислотными последовательностями, как и

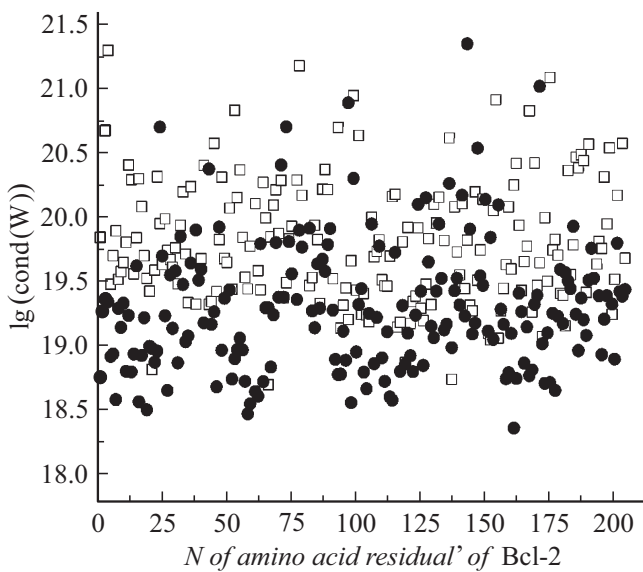


Рис. 10. Результаты численного расчета взаимодействия VN3-пептида белков Vim с белком Bcl-2 (закрашенные фигуры) и VN3-пептида белка Вах с белком Bcl-2 (незакрашенные фигуры).

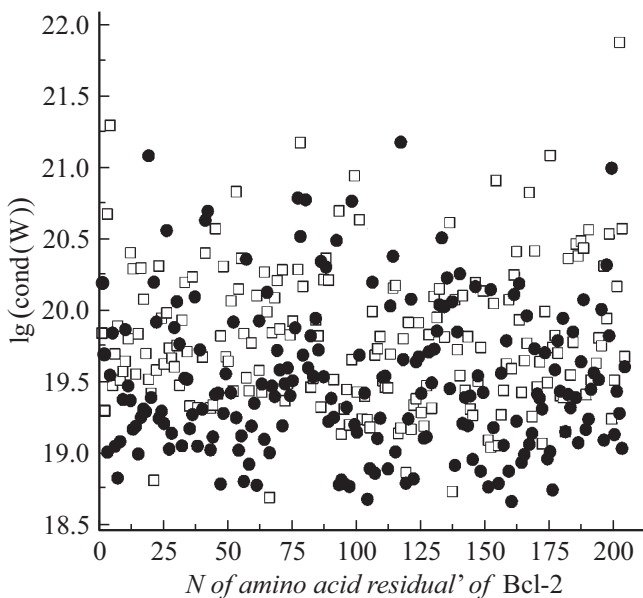


Рис. 11. Результаты численного расчета взаимодействия VN3-пептида белка Bid с белком Bcl-2 (закрашенные фигуры) и VN3-пептида белка Вах с белком Bcl-2 (незакрашенные фигуры).

все предыдущие, был выполнен согласно алгоритму 1. Результат численного расчета представлен на рис. 11.

Как видно из представленного графика, результаты значений величины $\lg(\text{cond}(W))$, полученные при взаимодействии $\text{Bid}_{(76-111)}-\text{Bcl-2}$, находятся в диапазоне более низких значений $\lg(\text{cond}(W))$, чем значения, полученные при взаимодействии $\text{Вах}_{(49-85)}-\text{Bcl-2}$, что говорит о более стабильном характере формирования

биологического комплекса, образованного аминокислотными последовательностями $\text{Bid}_{(76-111)}$ и Bcl-2, чем $\text{Вах}_{(49-85)}$ и Bcl-2. Полученные результаты находятся в хорошем качественном согласии с ранее выполненной экспериментальной работой [5], в которой указывается, что константа диссоциации (Kd) для соединения $\text{Bid}_{(76-111)}-\text{Bcl-2}$ примерно на порядок меньше, чем Kd для соединения $\text{Вах}_{(49-85)}-\text{Bcl-2}$.

Заключение

В настоящей работе был разработан новый метод, который позволяет:

- качественно определять Kd пептидов к полноразмерным белкам;

- определять влияние точечных мутаций в пептидах на устойчивость образованного комплекса с целыми белками.

Так, было выявлено качественное согласие полученных результатов с Kd на примере образования биологического комплекса VN3-пептидов белков Vmf, Puma, Vad, Hrk, Вах, Bik, Noxa, Bid, Vim, Vak с белком Bcl-xl.

Согласно ранее проведенному эксперименту [4], VN3-пептиды Vmf, Puma, Vad, Hrk, Вах, Bik, Noxa, Bid, Vim, Vak по степени аффинности к белку Bcl-xl можно разделить на 2 группы:

I группа содержит VN3-пептиды (Hrk, Вах, Bik, Noxa) с невысокой аффинностью к белку Bcl-xl;

II группа содержит VN3-пептиды (Vmf, Puma, Vad, Bid, Vim, Vak) с более высоким показателем аффинности к белку Bcl-xl.

Показателем аффинности в экспериментальной работе выступает константа диссоциации (Kd), в разработанном нами теоретическом подходе таким показателем выступает величина \bar{X} (среднее значение 10 минимальных значений величины $\lg(\text{cond}(W))$).

При анализе сродства каждого VN3-пептида к белку Bcl-xl было выявлено, что введенный нами параметр \bar{X} может служить мерой качественного согласия к экспериментально найденной величине Kd.

Также был проведен дополнительный анализ взаимодействия VN3-пептидов белков $\text{Vim}_{(136-171)}$ и $\text{Bid}_{(76-111)}$ с белком Bcl-2 на предмет исследования стабильности образованного ими биологического комплекса белком Bcl-2 и был найден для этого биологического соединения параметр \bar{X} , который сравнивался со значением \bar{X} при взаимодействии участка $\text{Вах}_{(49-85)}$ с белком Bcl-2.

Согласно ранее выполненному эксперименту [5], константа диссоциации Kd, отвечающая взаимодействию $\text{Вах}_{(49-85)}$ и белка Bcl-2, лежит в более высокой области значений, чем Kd, отвечающая взаимодействию VN3-пептидов $\text{Vim}_{(136-171)}$ и $\text{Bid}_{(76-111)}$ с белком Bcl-2. Так, взаимодействие VN3-пептида белка $\text{Вах}_{(49-85)}$ и Bcl-2 характеризуется $Kd = 15.1 \mu\text{mol}$, а взаимодействие

ВНЗ-пептидов $\text{Vim}_{(136-171)}$ и $\text{Bid}_{(76-111)}$ с Vcl-2 характеризуется $K_d = 2.44$ и $K_d = 4.57 \mu\text{mol}$ соответственно.

Вычисленная нами величина \bar{X} , отвечающая взаимодействию $\text{Вах}_{(49-84)}-\text{Vcl-2}$, $\text{Vim}_{(136-171)}-\text{Vcl-2}$ и $\text{Bid}_{(76-111)}-\text{Vcl-2}$ составила 18.966, 18.534 и 18.757 соответственно.

Также были исследованы влияния точечных мутаций на стабильность образованных биологических комплексов на примере взаимодействия ВНЗ-пептидов белка Вах , в которых были выполнены точечные замены аминокислотных остатков, с целым белком Vcl-2 . При этом образование биологического комплекса ВНЗ-пептида белка $\text{Вах}_{(49-85)}$ с Vcl-2 нами было принято за эталонное взаимодействие. Численные результаты взаимодействия белка $\text{Вах}_{(49-85)}$ с Vcl-2 сравнивались с остальными результатами взаимодействия ВНЗ-пептидов Вах с учетом замен аминокислотных остатков с белком Vcl-2 .

Вычисленное нами значение \bar{X} , характеризующее взаимодействие ВНЗ-пептида $\text{Вах}_{(49-85)}$ с белком Vcl-2 , лежит в более низком диапазоне значений, чем значения \bar{X} , полученные при взаимодействии ВНЗ-пептидов с выполненными заменами аминокислотных остатков, с белком Vcl-2 , что согласуется с экспериментальной работой [5].

Также был установлен участок белка Vcl-2 , обладающий наибольшим количеством минимальных значений величины $\lg(\text{cond}(W))$ при взаимодействии с $\text{Вах}_{(49-85)}$. Найденный нами в ходе теоретического эксперимента участок белка Vcl-2 совпал с обнаруженным ранее участком белка Vcl-2 со 107 по 146 а.а. [5].

Таким образом, мы предлагаем использовать данный результат по определению участка связывания пептида с целым белком для определения устойчивости формирования биологического комплекса тем или иным ВНЗ-пептидом белка Вах , в которых были выполнены замены аминокислотных остатков, с белком Vcl-2 путем анализа количества минимальных значений величины $\lg(\text{cond}(W))$ на данном участке белка Vcl-2 . Чем больше значений величины $\lg(\text{cond}(W))$ попали в область малых значений на заданном участке целого белка при связывании с пептидом, тем более стабилен образованный биологический комплекс.

Также был выполнен анализ влияния точечных мутаций в ВНЗ-пептидах белков Vik и Hrc на устойчивость образованного ими биологического комплекса с белком Vcl-x1 при замене аминокислотных остатков в ВНЗ-пептидах. Результаты выполненных теоретических исследований выявили качественное согласие введенного нами параметра \bar{X} с константой диссоциации K_d , которая была найдена в ходе эксперимента [4].

Таким образом, применение разработанных математических алгоритмов позволит находить оптимальные пептиды с учетом сродства к их мишеням и разрабатывать в будущем ингибиторы или активаторы белков-мишеней.

Список литературы

- [1] Hong Y, Xingchang P, Zhixiu S, Shaokang W, Ligang Y, Guiju S. // *Nutrients*. 2014. Vol. 6. N 2. P. 564–574.
- [2] Haiming D., Meng X.W., Scott H., Kaufmann S.H. // *Cancer Transl. Med.* 2016. Vol. 2. N 1. P. 7–20.
- [3] Ding J., Zhang Z., Roberts G.J., Falcone M., Miao Y., Shao Y., Zhang X.C., Andrews D.W., Lin J.J. // *Biol. Chem.* 2010. Vol. 285. N 37. P. 28749–28763.
- [4] Bhat V., Olenick M.B., Schuchardt B.J., Mikles D.C., McDonald C.B., Farooq A. // *Biopolymers*. 2014. Vol. 101. N 6. P. 573–582.
- [5] Ku B., Liang C., Jung J.U., Oh B.H., Bonsu Ku., Chengyu L., Jae U.J., Byung-Ha O. // *Cell Research*. 2011. Vol. 21. P. 627–641.
- [6] Электронный ресурс. Режим доступа: <http://www.uniprot.org/> (дата обращения 05.11.2017).
- [7] Dewson G. // *The Open Cell Signaling J.* 2011. Vol. 3. P. 3–8.