

Предсказание субстратной специфичности протеаз методами молекулярного моделирования

Елизарова Евгения, Залевский Артур

Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова
zheneliz147@gmail.com

Аннотация. В данном исследовании, на примере сериновой протеазы - тромбина человека и его взаимодействия с хромогенным субстратом S2238, мы предложили и протестировали вычислительный подход предсказания субстратной специфичности протеаз, основанный на методах молекулярного моделирования.

Ключевые слова: субстратная специфичность, тромбин, молекулярное моделирование

1 Введение

Протеазы представляют собой важный класс ферментов, участвующих в различных биохимических процессах. Данные о субстратной специфичности фермента играют ключевую роль в создании и разработке ингибиторов и различных препаратов, основанных на действии фермента. Более того, с развитием геномных методов получения различных последовательностей белков, было обнаружено огромное количество протеаз, особенно у растений, с неизвестной функцией. Однако определение субстратной специфичности экспериментальными методами является трудоемким и ресурсозатратным процессом, так как необходимо провести скрининг большого количества потенциальных пептидных субстратов. Таким образом, изучение субстратной специфичности различных классов ферментов становится актуальным и важным предметом для исследований. В рамках данной работы была поставлена следующая цель: разработать подход предсказания субстратной специфичности протеаз

2 Субстратная специфичность тромбина

Реакция протеолиза пептидного субстрата осуществляется посредством расщепления пептидной связи между остатками, расположенными в P1 и P1' позициях.[1] Для представителей семейства сериновых протеаз область кармана вокруг P1 сайта состоит из полярных и частично гидрофобных аминокислотных

остатков боковых цепей (Ser217, Thr184 и Tyr219). Это позволяет оптимально связывать не только заряженные, но и гидрофобные остатки в составе субстрата, такие как лейцин, тирозин. [2] Кроме того, глутамин и тирозин, также могут взаимодействовать с образованием водородных связей с полярными аминокислотными остатками на дне кармана с сохранением гидрофобных взаимодействий с остатками боковых цепей. Это обеспечивает оптимальное расположение субстрата, и тем самым способствует протеканию реакции расщепления.

Исследования показали, что в положении P1 пептидного субстрата наиболее вероятно располагается аргинин, который образует солевой мостик с Arg189, который в свою очередь расположен в глубине кармана специфичности. Гидрофобный карман S2, сформированный остатками 60й петли: Tyr60A, Pro60B, Pro60C, Trp60D имеет сродство к небольшой гидрофобной боковой цепи остатка в позиции P2. В данном положении в 71% встречается пролин, остальные 29 % приходятся на алифатические аминокислоты, такие как: глицин, валин, изолейцин. Наличие алифатических остатков в P2 присутствуют в ряде природных субстратов тромбина, включая фибриноген Aα и Bβ. Арил-связывающий сайт, образован остатками Leu99, Ile174 и Trp215, которые взаимодействуют с ароматическими и гидрофобными остатками в позиции P4, в то время, как остаток субстрата в позиции P3 обращен наружу от поверхности белка. В положение P1' с большой вероятностью встречаются такие аминокислотные остатки как: серин, треонин, глицин и аланин.[3]

Показано, что другие представители семейства сериновых протеаз имеют некоторые отличия в составе расщепляемого субстрата, в том числе в P1 позиции.

Ингибиторы тромбина представляют широкий интерес в связи с их применением в качестве антикоагулянтов (лекарственные средства, блокирующие ферментативные реакции, приводящие к образованию фибрина) в медицинской практике. Взаимодействия между пептидными лигандами, оказывающими ингибирующее действие также позволяет получать данные для изучения субстратной специфичности фермента. Одними из синтезированных ингибиторов в S1 сайте являются Trx-d-Cha-l-Aze-d-Tyr-l-homoArg (8-1), и его модифицированный вариант с гуанилиновым остатком на N конце.(8-5) . Ингибитор 8-5 образует водородную связь между гидроксильной группой D-Tyr и карбоксильным кислородом Asp 189. Из-за пространственной конформации лиганда, боковая цепь содержащая тирозин только частично проникает в карман, в отличие от положения аргинина, обычно находящегося в P1 положении субстрата. [4]

3 Результаты и обсуждение

3.1 Построение гомологичной модели

В связи, с возможным отсутствием нативных или релевантных к ним структур ферментов, появляется задача в первую очередь создать подобную модель. С по-

мощью пакета Modeller, была построена модель гомологичного белка из последовательности бычьего тромбина PDB ID:1AVG (разрешение 2.6 Å) на основе структуры человеческого тромбина PDB ID:3DUX. При визуализации полученных результатов, были выявлены отличия в положении субстрата относительно каталитического центра между гомологичной моделью и исходной структурой человеческого тромбина, что было связано с отсутствием важного для расположения субстрата аминокислотным остатком Glu 192. Далее докинг проводился в структуру имеющий данный аминокислотный остаток.

3.2 Множественный докинг

Для получения репрезентативных данных был проведен независимый множественный докинг хромогенного субстрата в нативную и гомологичные модели. По результатам которого было выявлено, что первые 7 моделей из 20 отражают сходное расположение лиганда относительно активного центра фермента в нативной и гомологичных структурах.

3.3 Докинг трипептидов

Для определения аминокислотного состава расщепляемых субстратов были созданы 8000 уникальных трипептидов (по комбинаторным вычислениям), которые в дальнейшем использовались в качестве субстрата. По результатам их докинга в гомологичную структуру тромбина, был построен мотив, отражающий вероятность нахождения аминокислот в позициях пептидного субстрата. (Рис.1)

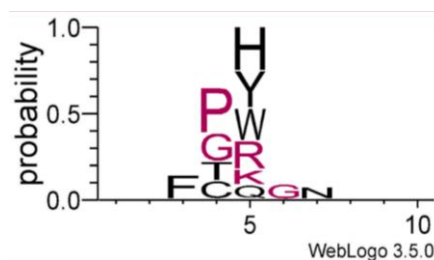


Рис.1 Сайт расщепления субстрата построенный по данным множественного докинга трипептидов.

Построенный паттерн выявил положение пролина и глицина в P2 позиции, аргинина и лизина в P1 сайте, а также глицина в P' позиции, что подтверждается ранее известными данными. Также было выявлено положение гистидина и тирозина в

P1 сайте, что также согласуется с ранее проведенными экспериментальными данными. Положение этих аминокислотных остатков в P1 сайте имеет биологическую роль. Согласно литературным данным, гистидин также встречается в данном положении в структурах естественных субстратов, в том числе в структуре антигемофильного глобулина (фактора VIII). Данный фактор вырабатывается в печени, селезенке, клетках эндотелия, лейкоцитах, почках. Протеолиз, осуществляемый тромбином при взаимодействии аминокислот каталитического центра с Arg372 фактора VIII, необходим для активации кофактора. Однако у больных гемофилией показана мутация по данному положению. Вместо аргинина там располагается гистидин, цистеин или пролин. При этом показано, что замена аргинина на пролин или цистеин приводит к более тяжелой форме гемофилии, нежели гистидиновый вариант. При этом наблюдается образование тромбов, что свидетельствует о протекании реакции протеолиза, осуществляемого тромбином. Структура фактора VIII при замене аргинина на гистидин не изменяется. Для оценки изменения скорости расщепления был искусственно создан мутантный фактор VIII (R372H). Согласно литературным данным, при сравнении с контрольной группой (дикий тип) скорость расщепления у R372H снизилась на 80%. Однако, протекание протеолиза свидетельствует о наличии взаимодействий между His372 фактора VIII и активным центром фермента.[5]

Помимо данных аминокислот обнаружено наличие триптофана в P1 положении субстрата, что можно считать результатом неточности пакета AutoDock Vina. В P1' позиции было обнаружено оптимальное расположение глицина, что полностью согласовывается с данными базы данных MEROPS. (Рис.2)



Рис.2 Сайт расщепления субстрата по данным базы MEROPS

4 Выводы

- Подобраны и оптимизированы параметры для докинга пептидных субстратов в структуру тромбина.
- Множественный докинг в гомологичную и нативную структуры выявил, что наиболее оптимально располагаются первые 7 из 20 моделей.
- В результате анализа положений хромогенного субстрата, полученных в результате независимого докинга в гомологичную и нативную структуры, было обнаружено значительное влияние GLU 192 на определение расположения субстрата, относительно каталитического центра. Это позволяет сделать вывод, о его роли в определении субстратной специфичности тромбина.
- Мотив, построенный по данным, полученным в результате докинга трипептидов, выявил положение пролина/глицина в P2, аргинина/лизина в P1 и глицина в P1' позициях, что согласуется с данными базы данных MEROPS. Наличие гистидина и тирозина в P1 положении также имеет биологическое значение. Появления триптофана в P1 позиции связано с особенностями молекулярного докинга.

Список литературы

1. Maiké Gallwitz, Mattias Enoksson, Michael Thorpe, Lars Hellman "The Extended Cleavage Specificity of Human Thrombin".
2. Pratap Singh,¹ * Aaron M. LeBeau,² Hans Lilja,³ Samuel R. Denmeade,^{1,4} and John T. Isaacs¹ "Molecular insights into substrate specificity of prostate specific antigen through structural modeling".
3. Le Bonniec BF¹, Myles T, Johnson T, Knight CG, Tapparelli C, Stone SR. "Characterization of the P2' and P3' specificities of thrombin using fluorescence-quenched substrates and mapping of the subsites by mutagenesis." *Biochemistry*. 1996 Jun 4;35(22):7114-22
4. Rainer Friedrich a , Daniel Riester b , Peter Gottig a , Marcel Thürk c , Andreas Schwienhorst b , Wolfram Bode "Structure of a novel thrombin inhibitor with an uncharged D-amino acid as P1 residue" *European Journal of Medicinal Chemistry* 43 (2008)
5. Keiji Nogami, Qian Zhou, Hironao Wakabayashi, and Philip J. Fay "Thrombin-catalyzed activation of factor VIII with His substituted for Arg372 at the P₁ site" 2005 Feb 10