

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 577.112+577.322
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-326-337>

Поступила в редакцию 10.04.2019
Received 10.04.2019

В. В. Побойнев¹, В. В. Хрусталёв¹, Т. А. Хрусталёва², А. Н. Стожаров¹

¹Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
²Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

СТРУКТУРНЫЕ ПЕРЕХОДЫ В СМЕШАННЫХ КЛАССАХ БЕЛКОВ

Аннотация. Изучены особенности аминокислотного состава участков белков классов «альфа + бета» и «альфа/бета», склонных к структурным переходам. Данные получены путём сравнения разных трёхмерных структур белков с абсолютно идентичной аминокислотной последовательностью. В работе не рассматривались фрагменты белков, расположение атомов в которых невозможно определить методом рентгеноструктурного анализа. Судя по более высокому проценту остатков, находящихся в структурно неустойчивых фрагментах, белки класса «альфа + бета» менее стабильны, чем белки класса «альфа/бета». Наиболее частым структурным переходом является укорочение *N*- и *C*-концов альфа-спиралей и бета-тяжей. Найдены и полностью «исчезающие» (переходящие в койл) альфа-спирали и бета-тяжи, аминокислотный состав которых несёт в себе ценную информацию, позволяющую выявить фрагменты белков, которые способны к переходу от альфа-спиралей к бета-тяжам и обладают сходным аминокислотным составом как с «исчезающими» альфа-спиралями, так и с «исчезающими» бета-тяжами. Аминокислотный состав способных к полному «исчезновению» альфа-спиралей достоверно отличается от такового способных к полному «исчезновению» бета-тяжей, что обусловлено высокой частотой использования аланина, глутамина и глутаминовой кислоты и низкой частотой использования изолейцина, треонина и глицина.

Ключевые слова: структурный переход, белок, бета-тяж, альфа-спираль, вторичная структура белка

Для цитирования: Структурные переходы в смешанных классах белков / В. В. Побойнев [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 326–337. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-326-337>

V. V. Poboinev¹, V. V. Khrustalev¹, T. A. Khrustaleva², A. N. Stojarov¹

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
²Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

STRUCTURAL TRANSITIONS IN MIXED CLASSES OF PROTEINS

Abstract. It was studied the features of amino acid content of protein regions of “alpha + beta” and “alpha/beta” classes, that are prone to structural transitions. The data have been obtained by the way of the comparison of different three-dimensional structures of proteins with absolutely identical amino acid sequence. In this study we ignored fragments of proteins in which positions of atoms cannot be determined with the help of *X*-ray crystallography. Proteins of “alpha + beta” class are less stable than proteins of “alpha/beta” class, since the percent of structurally instable residues in them is higher. Most frequent type of structural transitions is the decrease of length of *N*-terminal and *C*-terminal parts of alpha helices and beta strands. Alpha helices and beta strands that can completely disappear (turn to coil) have also been found. The data of their amino acid content is important for the development of the method able to detect fragments of proteins prone to transitions from alpha helix to beta strand. Those fragments should combine characteristic features of amino acid content of both completely disappearing alpha helices and completely disappearing beta strands. The amino acid composition of alpha-helices capable to complete disappearance is significantly different from that for beta-strands capable to complete disappearance: frequencies of alanine, glutamine and glutamic acid usage are increased, frequencies of isoleucine, threonine and glycine usage are reduced.

Keywords: structural transition, protein, beta-strand, alpha-helix, secondary structure of protein

For citation: Poboinev V. V., Khrustalev V. V., Khrustaleva T. A., Stojarov A. N. Structural transitions in mixed classes of proteins. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 326–337 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-3-326-337>

Введение. В соответствии со структурной классификацией SCOP [1] все белки можно разделить на 7 основных классов. К первым двум классам относятся альфа-спиральные белки, вторичная структура которых представлена в основном альфа-спиралями, и бета-структурные, вторичная структура которых представлена в основном бета-тяжами. Конечно, как в альфа-спиральных белках возможно формирование немногочисленных бета-тяжей, так и в бета-структурных белках

возможно формирование отдельных альфа-спиралей. Лишь некоторые из таких одиночных альфа-спиралей и бета-структур могут отличаться повышенной стабильностью. Примером альфа-спиральных белков является человеческий интерлейкин-6 (PDB-идентификатор: 1ALU), примером бета-структурных белков – иммуноглобулин (PDB-идентификатор FC-фрагмента IGG1: 1DN2). К третьему классу относятся мембранные белки и пептиды (за исключением белков и пептидов иммунной системы). К четвёртому – небольшие белки, имеющие в первичной структуре до 100 аминокислотных остатков. Третичная структура белков данного класса обычно поддерживается дисульфидными связями, взаимодействием с лигандами и кофакторами [1]. В белках класса «альфа + бета» существуют отдельные альфа-спиральные и бета-структурные области, т. е. из одной части аминокислотной последовательности формируются альфа-спираль, а из другой – бета-структуры. В белках класса «альфа/бета» отдельные альфа-спиральные и бета-структурные области выделить нельзя (чаще всего в них альфа-спираль и бета-тяжи чередуются друг с другом через один элемент вторичной структуры). В соответствии со структурной классификацией можно также выделить класс белков «альфа и бета». Для данных белков характерно наличие отдельных доменов, принадлежащих к разным классам.

Белки разных классов отличаются по своему аминокислотному составу. Согласно термодинамическим расчётам, белки разных классов отличаются по уровню структурной стабильности [2], а значит, на возможность осуществления структурного перехода должна влиять аминокислотная последовательность белка. Известен целый ряд заболеваний, возникновение которых обусловлено изменением конформации белковых молекул. К конформационным заболеваниям относят прионные болезни: губчатые энцефалопатии млекопитающих (бычья губчатая энцефалопатия или коровье бешенство, скрэпи овец) и нейродегенеративные заболевания человека (болезни Крейтцфельда–Якоба и Герстмана–Штраусслера–Шейнкера, семейную фатальную бессонницу и куру) [3, 4]. Эти заболевания могут быть наследственными, приобретенными и спорадическими [3, 4]. Прионные заболевания могут передаваться от человека человеку или от животных человеку [5], что повышает актуальность раскрытия механизмов перехода нормального прионного белка в его патологическую форму, а именно переход альфа-спиралей в бета-тяжи. Следовательно, инфекционным агентом для таких заболеваний является аномальная (бета-структурная) форма прионного белка [6].

К конформационным относят также амилоидные заболевания, такие как болезни Альцгеймера, Хангтингтона и Паркинсона, при которых происходит вне- или внутриклеточное накопление белковых агрегатов фибриллярной структуры, в норме представляющих собой растворимые клеточные белки [7]. При этом на эти заболевания не распространяется прионная концепция, что тормозит развитие их этиотропной терапии. Знание возможного механизма перехода одних элементов вторичной структуры в другие позволит ускорить разработку ингибиторов для того или иного структурного перехода.

Структурные переходы в какой-то мере можно объяснить схожим аминокислотным составом различных элементов вторичной структуры: альфа-спираль обогащена такими аминокислотными остатками, как аланин, глутаминовая кислота, глутамин, лейцин, аргинин, лизин, метионин [8]. При этом все эти аминокислотные остатки в той или иной степени могут включаться и в состав бета-тяжей, которые в среднем содержат больше валина, изолейцина, фенилаланина, тирозина и треонина, чем альфа-спираль и неструктурированные участки [9], т. е. обогащены гидрофобными аминокислотными остатками. Однако помимо гидрофобных бета-тяжей встречаются и относительно гидрофильные, с чередованием гидрофобных и гидрофильных остатков через один [10].

Цель исследования – определить особенности структурно неустойчивых мотивов белков классов «альфа + бета» и «альфа/бета», склонных к переходам от альфа-спиралей и бета-тяжей к неструктурированному состоянию, предположить особенности аминокислотного состава фрагментов белков, склонных к переходам от альфа-спирального к бета-структурному состоянию.

Практическая значимость работы заключается в том, чтобы выявить особенности фрагментов белков, склонных к структурным переходам. На основании полученной информации планируется создать алгоритм, с помощью которого можно выявлять участки альфа-спиралей

и бета-тяжей, склонных переходить в неструктурированное состояние, а также фрагменты белков, в которых возможен переход альфа-спиралей в бета-тяжи. Поиск таких структурно неустойчивых фрагментов белков важен в рамках разработки возможных методов ингибирования данного перехода, а соответственно, и лечения конформационных заболеваний.

На сегодняшний день стало возможным изучение структурных переходов с использованием известных структур белков, без компьютерного моделирования строения нормальных и мутантных белков, так как количество 3D-структур в международном банке данных (PDB) растёт стремительными темпами. Например, если в 2000 г. известно было лишь 13589 структур, то на апрель 2019 г. их насчитывалось уже 150593 [11]. Один и тот же белок зачастую представлен несколькими 3D-структурами, построенными разными авторами по результатам рентгеноструктурного анализа или ядерно-магнитного резонанса в разных условиях, в комплексе с различными лигандами. Если ранее можно было сравнивать эти структуры друг с другом с целью раскрытия конформационной изменчивости каждого отдельно взятого белка, то сейчас стало возможным изучение общих механизмов структурных переходов для целых классов белков.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования послужили две выборки трёхмерных структур белков человека и других эукариот из международной базы данных Protein Data Bank (www.pdb.org). Белки, вошедшие в состав каждой выборки (по 100 белков класса «альфа/бета» и класса «альфа + бета»), не являлись гомологичными (степень сходства между аминокислотными последовательностями белков в каждой выборке не превышала 25 %). Для определения степени их сходства использовали алгоритм Decrease Redundancy (www.web.expasy.org/decrease_redundancy). При этом в выборку попадали лишь те белки, для которых существует хотя бы одна аминокислотная последовательность со 100 %-ной идентичностью к исследуемой. В данной работе нами не использовались белки, которые нельзя классифицировать однозначно. Кроме того, если белок был представлен олигомером, одну цепь которого можно отнести или к классу «альфа/бета», или к классу «альфа + бета», то в выборку включали только ту цепь, которую можно отнести к одному из исследуемых нами классов белков. Элементы вторичной структуры определяли с помощью алгоритма DSSP (www.swift.cmbi.umcn.nl/gv/dssp). Все фрагменты полипептидной цепи, не образующие альфа-спирали и бета-тяжи, классифицировались как койл.

При рассмотрении структурной неустойчивости были выделены четыре возможных случая нахождения конкретной аминокислоты: альфа-спираль/койл (НС), бета-тяж/койл (ЕС), альфа-спираль/бета-тяж (НЕ) и альфа-спираль/бета-тяж/койл (НЕС). НС – случай, когда аминокислота находится в составе альфа-спирали на одной структуре белка и в койле на другой структуре белка со 100 %-ной аминокислотной идентичностью; ЕС – случай, когда аминокислота может находиться как в бета-тяже, так и в койле белков со 100 %-ной аминокислотной идентичностью; НЕ – случай, когда аминокислота может находиться в альфа-спирали или в бета-тяже белка со 100 %-ной аминокислотной идентичностью; НЕС – случай, когда аминокислота может находиться или в альфа-спирали, или в бета-тяже, или в неструктурированном участке белка со 100 %-ной аминокислотной идентичностью. Участки белков с отсутствующей электронной плотностью на рентгенологической структуре не учитывали.

Аминокислотный состав структурно изменчивых участков белков сравнивали с аминокислотным составом устойчивых к структурным переходам фрагментов альфа-спиралей, бета-тяжей и койла. Локализацию фрагментов НС определяли относительно границ структурно устойчивых альфа-спиралей. Выделяли фрагменты НС, которые граничат как с N-, так и с C-концом альфа-спирали, а также фрагменты НС, которые не граничат со структурно устойчивыми фрагментами альфа-спиралей. Аналогичным образом были проклассифицированы фрагменты ЕС относительно локализации устойчивых бета-тяжей.

Пентапептидный состав рассчитывали с учётом разделения всех аминокислот на гидрофобные (O) и гидрофильные (W), сформировав 32 возможных варианта. При разделении элементов вторичной структуры на пентапептиды использовали метод скольжения с шагом в одну аминокислоту, с учётом того, что переменный аминокислотный остаток занимает третье положение в пентапептиде.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью *t*-критерия для относительных значений.

Результаты исследования. Особенности неустойчивых фрагментов альфа-спиралей. Среди участков с неустойчивой вторичной структурой практически отсутствовали те, которые могут образовывать как альфа-спираль, так и бета-тяж. Этот факт свидетельствует о том, что такие переходы «запрещены» в подавляющем большинстве белков. При этом процент остатков, находящихся в составе альфа-спиралей на одних структурах и в составе неструктурированных участков (в койле) на других довольно велик, так же как и процент остатков, способных находиться как в составе бета-тяжа, так и в койле. Особенности участков НС (в которых «разрешен» переход из альфа-спирали в койл и обратно) и ЕС (в которых «разрешен» переход из бета-тяжа в койл и обратно) посвящена большая часть данной работы.

Для частот встречаемости остатков из фрагментов НС характерно распределение, отличное от такового для альфа-спиралей и койла. Тем не менее фрагменты НС ближе по своему составу к альфа-спиралям, нежели к койлу. Аминокислотный состав фрагментов НС не соответствует среднему аминокислотному составу альфа-спиралей и койла. Исходя из этого, можно предположить, что большая часть фрагментов НС – это альфа-спирали и их участки, которые при определенных обстоятельствах способны переходить в неструктурированное состояние. Причиной появления самой возможности таких переходов могут быть единичные аминокислотные замены, дестабилизирующие альфа-спиральную конформацию.

Аминокислотные остатки можно разделить на несколько групп, в зависимости от частоты их использования во фрагментах НС, в альфа-спиралях и койле, в среднем – в альфа-спиралях и койле. Остатки Gly/Pro/Asp («брейкеры»: глицин, пролин и аспарагиновая кислота) в сумме достоверно реже встречаются во фрагментах НС, чем в койле, в среднем – в койле и альфа-спиралях. При этом в белках класса «альфа + бета» Gly/Pro/Asp достоверно больше во фрагментах НС (табл. 1), чем в альфа-спиралях, чего нельзя сказать о белках класса «альфа/бета» (табл. 2).

Таблица 1. Различия в суммарных частотах встречаемости аминокислотных остатков белков класса «альфа + бета» в устойчивых альфа-спиралях (Н), койле (С), в участках, способных существовать как в составе альфа-спирали, так и в составе койла (НС), в среднем по альфа-спиралям и койлу (Н + С)

Table 1. Differences in the total frequencies of amino acid residues of “alpha + beta” class proteins in stable alpha helices (H), random coil (C), in areas that can exist both in the alpha helix and in the random coil (HC), on average in alpha helices and random coil (H + C)

Группа аминокислотных остатков	Сравниваемые элементы вторичной структуры			
	Н/С	НС/С	НС/Н	Н + С/НС
Gly/Pro/Asp	↓	↓	↑	↑
Leu/Gln/Ala/Glu	↑	↑	↓	↓
His/Arg/Lys	=	↑	↑	↓
Tyr/Trp	↑	=	↓	=
Ser/Asn	↓	=	↑	=
Met/Ile/Val/Phe/Cys/Thr	↑	=	↓	=

Примечание. В табл. 1–4 достоверность различий между группами: «↑» – более высокая частота, «↓» – более низкая частота, «=» – нет различий.

Известные «формирователи» альфа-спиралей (Leu/Gln/Ala/Glu: лейцин, глутамин, аланин и глутаминовая кислота) во фрагментах НС, наоборот, встречаются достоверно чаще, чем в койле и в среднем – в койле и альфа-спиралях. В белках класса «альфа + бета» (см. табл. 1) Leu/Gln/Ala/Glu имеют более низкую общую частоту использования во фрагментах НС, чем в альфа-спиралях, в отличие от белков «альфа/бета» (табл. 2).

Характерной особенностью фрагментов НС в обоих классах белков является высокая частота использования положительно заряженных остатков His/Arg/Lys (гистидина, аргинина и лизина), превышающая таковую даже в альфа-спиралях.

Таблица 2. Различия в суммарных частотах встречаемости аминокислотных остатков белков класса «альфа/бета» в устойчивых альфа-спиралях (Н), койле (С), в участках, способных существовать как в составе альфа-спирали, так и в составе койла (НС), в среднем по альфа-спиралям и койлу (Н + С)

Table 2. Differences in the total frequencies of amino acid residues of “alpha/beta” class proteins in stable alpha helices (H), random coil (C), in areas that can exist both in the alpha helix and in the random coil (HC), on average in alpha helices and random coil (H + C)

Группа аминокислотных остатков	Сравниваемые элементы вторичной структуры			
	Н/С	НС/С	НС/Н	Н + С/НС
Gly/Pro/Asp	↓	↓	=	↑
Leu/Gln/Ala/Glu	↑	↑	=	↓
His/Arg/Lys	↑	↑	↑	↓
Tyr/Trp	=	=	=	=
Ser/Asn	↓	=	↑	=
Met/Ile/Val/Phe/Cys/Thr	↑	=	↓	↑

Остатки тирозина и триптофана (Tyr/Trp) в белках класса «альфа/бета» не отличаются какими-либо особенностями в распределении по рассматриваемым фрагментам, а в белках класса «альфа + бета» их больше в альфа-спиралях, чем в койле и во фрагментах НС.

Остатков серина и аспарагина (Ser/Asn) достоверно больше во фрагментах НС, чем в спиралах, а в последних они не настолько распространены, как в койле.

Аминокислотные остатки Met/Ile/Val/Phe/Cys/Thr (метионин, изолейцин, валин, фенилаланин, цистеин и треонин) чаще встречаются в альфа-спиралях, чем в койле, а во фрагментах НС – чаще, чем в среднем по альфа-спиралям и койлу в белках класса «альфа/бета». Известно, что такие аминокислотные остатки, как изолейцин, валин, фенилаланин, цистеин и треонин, являются «формирователями» бета-структуры. При этом в белках обоих рассматриваемых классов их меньше во фрагментах НС, чем в альфа-спиралях, что говорит об их повышенной защищенности от возможных переходов в бета-структуру.

Следует отметить, что в участках НС количество аминокислотных остатков на С-концах альфа-спиралей, в 3 раза больше, чем на N-концах. То есть альфа-спирали меняют свою длину чаще за счёт «расплетания» С-концов, чем N-концов. Полное разрушение альфа-спирали происходит редко: количество остатков в НС на N-конце спиралей примерно равно таковому в «исчезающих» альфа-спиралях. По этой причине аминокислотные остатки, часто встречающиеся как на С-концах альфа-спиралей [12], так и в койле за ними (Ser/Asn/His/Arg/Lys), имеют высокие частоты использования в целом во фрагментах НС. В отличие от них, «брейкеры» Gly/Pro/Asp, а также Glu часто находятся на N-концах альфа-спиралей или в койле перед ними.

Важно отметить, что 11,12 % альфа-спиралей имеют неустойчивый N-конец, при этом каждая третья альфа-спираль (33,74 %) имеет неустойчивую область на С-конце. Информация о структурной неустойчивости концов альфа-спиралей важна для разработки алгоритма, способного корректно определять их длину. Информация о возможности полного исчезновения альфа-спиралей (рис. 1) особенно важна для изучения патогенеза конформационных заболеваний.

Длина N- и С-концевых неустойчивых фрагментов альфа-спиралей, как правило, составляет от одного до трёх аминокислотных остатков (на N-конце: один остаток – в 53,55 % случаев, два – в 21,86 %, три – в 13,11 %; на С-конце: один остаток – в 65,41 % случаев, два – в 20,54 %, три – в 6,85 %). Длина «исчезающих» альфа-спиралей в большинстве случаев минимальна – 4 аминокислотных остатка (в 53,97 % случаев). При изменении конформации такие альфа-спирали зачастую формируют спирали 3/10, которые в данной работе классифицируются как койл. Действительно, 49,85 % аминокислотных остатков из «исчезающих» альфа-спиралей находятся в составе спиралей 3/10 хотя бы в одном из структурных вариантов белка. Как правило, для спиралей 3/10 характерна длина в три или в пять аминокислотных остатков [13]. Поэтому многие «исчезающие» альфа-спирали укорачиваются, переходя частью своих остатков в спирали 3/10.

В целом, альфа-спирали, полностью превращающиеся в койл, обладают аминокислотным составом, более близким к альфа-спиралям, чем к койлу (рис. 1). В таких альфа-спиралях частота использования пролина достоверно выше, чем в устойчивых альфа-спиралях, а частота исполь-

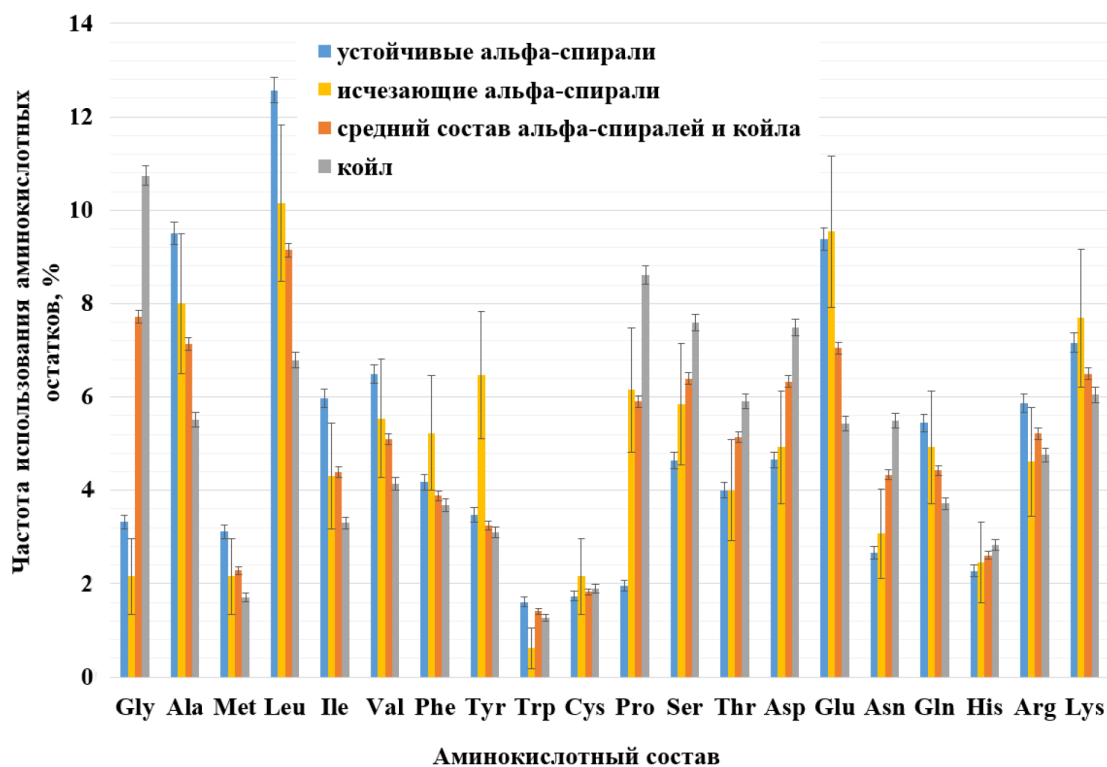


Рис. 1. Частота использования аминокислотных остатков в альфа-спиралях и койле, %

Fig. 1. Percentage of amino acids in alpha helices and random coil, %

зования лейцина – ниже. Высокую частоту использования в них пролина можно объяснить их небольшой длиной: пролин может находиться только в первых трёх положениях альфа-спиралей. Специфической чертой таких спиралей, обуславливающей их неустойчивость, может быть низкая частота использования лейцина. В обсуждаемых альфа-спиралях таких «брейкеров», как глицин, пролин, серин и аспарагин, достоверно меньше, чем в койле, а альфа-спиральных лейцина, аланина и глутаминовой кислоты – достоверно больше, так же как и тирозина.

По пентапептидному составу «исчезающие» альфа-спирали похожи как на устойчивые альфа-спирали, так и на койл. Резкие различия в нашей выборке касаются повышенной частоты использования пентапептида WWOWW в таких спиралах по сравнению с койлом при более низкой частоте использования бета-структурного пентапептида OOOOO [14], чем в устойчивых альфа-спиралях и койле.

Особенности неустойчивых фрагментов бета-тяжей. По распределению частот встречаемости аминокислотных остатков фрагменты ЕС отличаются как от бета-тяжей, так и от койла. Кроме того, нельзя считать состав фрагментов ЕС усредненным составом бета-тяжей и койла.

В структурно изменчивых фрагментах ЕС значительно снижена частота использования такого альфа-спирального остатка, как аланин. Его частота достоверно ниже в ЕС, чем в устойчивых бета-тяжах и койле. Этот факт свидетельствует о «запрете» на переходы от бета-тяжа к альфа-спирали и обратно в таких фрагментах.

Остатки Thr/Glu/Arg/Lys в обоих классах белков в большей степени используются во фрагментах ЕС, чем в бета-тяжах. При этом в белках обоих классов их суммарная частота использования одинакова в ЕС и койле (табл. 3). Эти данные свидетельствуют о высокой степени гидрофильности бета-тяжей и их фрагментов, подверженных структурным переходам в койл.

Частоты использования «брейкеров» Gly/Pro/Ser/Asp/Asn/His во фрагментах ЕС выше, чем в устойчивых бета-тяжах, но не достигают среднего значения для бета-тяжей и койла. Частоты использования «формирователей» бета-тяжей Ile/Val/Tyr во фрагментах ЕС, напротив, понижены по сравнению с устойчивыми бета-тяжами, но остаются на более высоком уровне, чем в среднем по бета-тяжам и койлу.

Частоты использования остатков Met/Leu/Phe/Trp/Cys/Gln, большая часть которых обладает альфа-спиральным потенциалом, тем не менее, выше в бета-тяжах, чем в койле, но ниже во фрагментах ЕС, чем в бета-тяжах. В белках обоих классов частоты использования Met/Leu/Phe/Trp/Cys/Gln во фрагментах ЕС достоверно выше, чем в койле (табл. 3, 4).

Т а б л и ц а 3. Различия в суммарных частотах встречаемости аминокислотных остатков белков класса «альфа + бета» в устойчивых бета-тяжах (Е), койле (С), в участках, способных существовать как в составе бета-тяжа, так и в составе койла (ЕС), в среднем по бета-тяжам и койлу (Е + С)

Table 3. Differences in the total frequencies of amino acid residues of “alpha + beta” class proteins in stable beta-strands (E), random coil (C), in areas that can exist both in beta-strands and in the random coil (EC), on average in beta-strands and random coil (E + C)

Группа аминокислотных остатков	Сравниваемые элементы вторичной структуры			
	Е/С	ЕС/С	ЕС/Е	Е + С/ЕС
Thr/Glu/Arg/Lys	↓	=	↑	↓
Ala	=	↓	↓	↑
Gly/Pro/Ser/Asp/Asn/His	↓	↓	↑	↑
Ile/Val/Tyr	↑	↑	↓	↓
Met/Leu/Phe/Trp/Cys/Gln	↑	↑	↓	=

Т а б л и ц а 4. Различия в суммарных частотах встречаемости аминокислотных остатков белков класса «альфа/бета» в устойчивых бета-тяжах (Е), койле (С), в участках, способных существовать как в составе бета-тяжа, так и в составе койла (ЕС), в среднем по бета-тяжам и койлу (Е + С)

Table 4. Differences in the total frequencies of amino acid residues of proteins of class “alpha/beta” in stable beta-strands (E), random coil (C), in areas that can exist both in the beta-strands and in the random coil (EC), on average in beta-strands and random coil (E + C)

Группа аминокислотных остатков	Сравниваемые элементы вторичной структуры			
	Е/С	ЕС/С	ЕС/Е	Е + С/ЕС
Thr/Glu/Arg/Lys	↓	=	↑	↓
Ala	=	↓	↓	↑
Gly/Pro/Ser/Asp/Asn/His	↓	↓	↑	↑
Ile/Val/Tyr	↑	↑	↓	↓
Met/Leu/Phe/Trp/Cys/Gln	↑	↑	↓	=

Приведенные данные показывают, что аминокислотный состав «исчезающих» бета-тяжей в белках классов «альфа + бета» близок к таковому в белках класса «альфа/бета». Тенденции, приведенные в табл. 3, полностью воспроизводятся в табл. 4.

Количество аминокислотных остатков во фрагментах ЕС, расположенных на *N*- и *C*-концах бета-тяжей, примерно одинаково. Приблизительно в 2 раза меньше остатков во фрагментах ЕС из полностью «исчезающих» бета-тяжей. Информация об аминокислотном составе последних приведена на рис. 2.

Длина структурно неустойчивых *N*- и *C*-концевых фрагментов бета-тяжей составляет обычно один-два остатка (на *N*-конце: один остаток – в 72,16 % случаев, два – в 19,16 % случаев; на *C*-конце: один остаток – в 78,86 % случаев, два – в 13,43 % случаев). Около 16 % бета-тяжей имеют структурно неустойчивый *N*-конец, столько же – неустойчивый *C*-конец.

Длина «исчезающих» бета-тяжей, как правило, составляет два-три остатка (два остатка – в 63,35 % случаев, три – в 18,01 % случаев), хотя встречаются и довольно длинные бета-тяжи до 10 остатков длиной, полностью «исчезающие» на некоторых 3D-структурах абсолютно идентичных белков. В таких бета-тяжах достоверно больше пролина и глицина и достоверно меньше валина, лейцина и аланина, чем в структурно устойчивых бета-тяжах. Тем не менее, в них достоверно больше сильных «формирователей» бета-структуры (изолейцина, валина, тирозина), чем в койле, а также в них реже встречаются «брейкеры»: глицин, пролин, аспарагиновая кислота и аспарагин. Изолейцина в неустойчивых бета-тяжах достоверно больше, чем в среднем по койлу

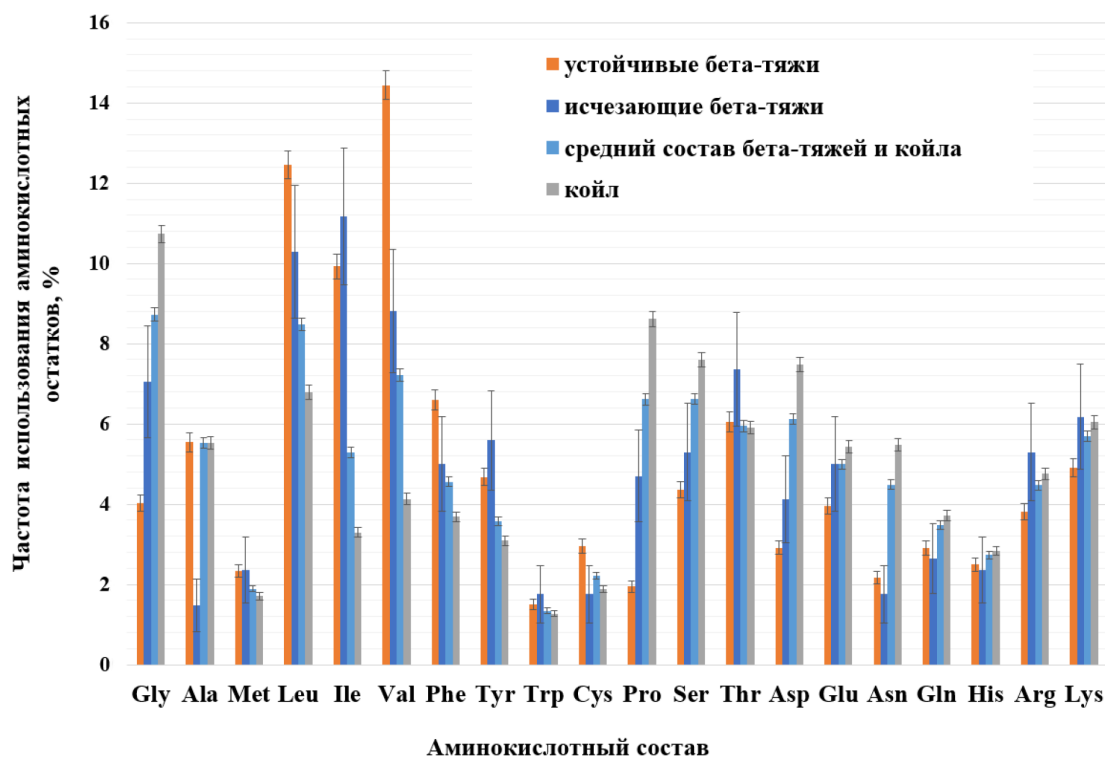


Рис. 2. Частота встречаемости аминокислотных остатков в бета-тяжах и койле, %

Fig. 2. Percentage of amino acids in beta strands and random coil, %

и устойчивым бета-тяжам. Именно в «исчезающих» бета-тяжах, а не в концевых фрагментах устойчивых бета-тяжей особенно заметно снижение частоты использования аланина.

Пентапептидный состав «исчезающих» бета-тяжей гораздо ближе к составу койла, чем к составу устойчивых бета-тяжей. Гидрофобные пентапептиды в «исчезающих» бета-тяжах встречаются достоверно реже, чем в устойчивых. Нельзя не подчеркнуть высокие частоты использования таких альфа-спиральных пентапептидов, как WOOWW и WWOOW [14] в «исчезающих» бета-тяжах. Лишь специфические комбинации аминокислотных остатков (в частности, низкая частота использования аланина) могут предотвратить переход от бета-тяжа к альфа-спирали в таких пентапептидах.

Обсуждение. Элементы вторичной структуры формируются на ранних этапах фолдинга белка [15]. Формирование регулярных водородных связей по типу main chain – main chain должно быть энергетически выгодно само по себе. При этом существенный (а порой решающий) вклад в тепловой эффект от образования вторичной структуры вносят слабые взаимодействия (в основном гидрофобные) между радикалами аминокислот, а также водородные связи по типу main chain – side chain и side chain – side chain [2]. Считается, что альфа-спирали как элемент вторичной структуры более устойчивы, чем бета-тяжи, так как известно, что альфа-спирали могут накапливать мутации без изменения вторичной структуры в большей мере, чем бета-тяжи [16]. На основании этого можно предположить, что альфа-спирали в меньшей степени склонны к структурным переходам.

Интересен тот факт, что в белках обоих классов обнаружено большое количество нестабильных участков белков, в которых возможны переходы как бета-тяжей в койл и обратно, так и альфа-спиралей в койл и обратно, но переходов альфа-спиралей в бета-тяжи в белках «альфа/бета» не выявлено, при этом в исследованных белках «альфа + бета» найдено только три таких перехода. Однако известны заболевания, при которых на месте альфа-спиралей образуются бета-тяжи, т. е. переход альфа-спиралей в бета-тяжи, по всей видимости, происходит через промежуточные стадии формирования койла или полностью неструктурированного состояния, которое невозможно обнаружить методом рентгеновской кристаллографии. Кроме того, установлено, что

переходов койла в бета-тяжи и обратно больше в белках класса «альфа + бета», чем в белках класса «альфа/бета». Это ещё раз подтверждает тот факт, что белки класса «альфа/бета» более стабильные.

Согласно нашей гипотезе, участки белков, способные к переходу из альфа-спирали в бета-тяжи и обратно, должны обладать аминокислотным составом, сочетающим особенности как «исчезающих» альфа-спиралей, так и «исчезающих» бета-тяжей. Тогда альфа-спирали смогут перейти в койл, а на месте койла сможет сформироваться бета-тяж. При сравнении аминокислотного состава «исчезающих» бета-тяжей и альфа-спиралей выяснилось, что между ними есть только шесть достоверных различий. Структурно неустойчивые бета-тяжи отличаются от неустойчивых альфа-спиралей приблизительно в 4 раза пониженной частотой использования аланина и почти в 2 раза более низкой частотой использования глутаминовой кислоты и глутамина. При появлении этих альфа-спиральных аминокислотных остатков во фрагментах ЕС вероятность образования ими альфа-спирали должна существенно повышаться. В большинстве случаев, судя по нашим данным, такие мутации подвергаются элиминации. Структурно неустойчивые альфа-спирали обеднены глицином (приблизительно в 3 раза), изолейцином (более чем в 2,5 раза) и треонином (почти в 2 раза) по сравнению с неустойчивыми бета-тяжами. Следовательно, появление изолейцина и треонина во фрагментах НС должно повышать вероятность формирования ими бета-тяжа, а появление глицина должно способствовать поворотам полипептидной цепи с целью её правильной ориентации для образования бета-структуры. Согласно полученным данным, фрагменты белков, в которых облегчен структурный переход из альфа-спирального состояния в бета-структурное, должны обладать повышенной частотой использования как альфа-спиральных аланина, глутамина и глутаминовой кислоты, так и бета-структурных изолейцина и треонина с глицином. Интересно, что в некоторых случаях фрагменты белка, способные к переходу из альфа-спирали в бета-тяж и обратно, выполняют такую важную биологическую функцию, как, например, участие в механизме активации рецепторов факторов роста [17].

Следует также отметить статистически одинаковые частоты использования цистеина в белках обоих классов. При этом нет никаких достоверных различий во встречаемости цистеина во фрагментах ЕС или НС белков какого-либо из смешанных классов, т. е. значение дисульфидных связей в переходах вторичной структуры велико только для отдельных белков, а не представляет собой фундаментальное явление для белков класса «альфа + бета» или «альфа/бета». Наличие же дисульфидных связей в переменных областях белков, наоборот, должно стабилизировать их вторичную структуру и предотвращать структурный переход, как, например, в рибонуклеазе А [18].

При любых структурных переходах происходит изменение общей энергии системы, на которую, как известно, влияют энтальпийный и энтропийный факторы, вклад которых различен при формировании тех или иных элементов вторичной структуры. Обычно в альфа-спиралях аминокислотные остатки образуют большее количество взаимодействий, чем в бета-тяжах [16]. То есть энтропия при образовании альфа-спиралей снижается в большей степени, чем при образовании бета-структуры, что должно способствовать переходу из альфа-спирали в бета-тяж. Из-за большего количества взаимодействий между аминокислотными остатками энтальпия при образовании альфа-спиралей снижается в большей степени, чем при формировании бета-тяжей, что должно способствовать переходу из бета-тяжа в альфа-спираль. Естественно, в каждом конкретном случае степени снижения энтальпии и энтропии могут существенно варьироваться, способствуя формированию того или иного типа вторичной структуры. Чем больше количество гидрофобных аминокислотных остатков взаимодействуют друг с другом в составе бета-структуры, тем большим должен быть тепловой эффект от её формирования и тем вероятнее смещение равновесия в сторону её образования. Поэтому повышенное процентное содержание изолейцина, фенилаланина, тирозина, валина в обоих классах белков способствует формированию гидрофобного бета-структурного кластера.

Терапию заболеваний, сопровождающихся альфа-бета переходом, рационально проводить только до возникновения признаков заболевания и направлять её на предотвращение самой воз-

возможности такого перехода. Другими словами, для каждого конформационного заболевания в идеале можно подобрать ингибитор (белковой природы или низкомолекулярный миметик антитела [19]), препятствующий структурному переходу конкретной области соответствующего белка. Обнаружить «мишени» для разработки такой терапии можно с помощью полученных в данной работе знаний об аминокислотном составе «исчезающих» альфа-спиралей и бета-тяжей.

Выводы

1. В белках класса «альфа + бета» частота использования аминокислотных остатков, склонных к структурным переходам, достоверно выше (7,82 %), чем в белках класса «альфа/бета» (5,42 %).

2. Аминокислотный состав структурно неустойчивых фрагментов белков, в особенности класса «альфа/бета», контролируется естественным отбором на стадии элиминации неблагоприятных аминокислотных замен: «разрешенными» являются переходы единичных аминокислотных остатков из альфа-спиралей в койл и из бета-тяжей в койл (в большинстве случаев на *N*- и *C*-концах альфа-спиралей и бета-тяжей), а переходы из альфа-спиралей в бета-тяжи, как правило, «запрещены».

3. Наиболее часто структурным переходам из альфа-спирали в койл (что характерно для каждой третьей альфа-спирали) подвержены *C*-концевые остатки альфа-спиралей, обогащенные положительно заряженными аминокислотными остатками.

4. Аминокислотный состав способных к полному «исчезновению» альфа-спиралей достоверно отличается от такового способных к полному «исчезновению» бета-тяжей, что обусловлено повышенной частотой использования аланина, глутамина и глутаминовой кислоты и пониженной частотой использования изолейцина, треонина и глицина.

Список использованных источников

1. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures / A. G. Murzin [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1995. – Vol. 247, N 4. – P. 536–540. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80134-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80134-2)
2. Термодинамическая характеристика стабильности структуры белков четырех классов / В. В. Побойнев [и др.] // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : междунар. науч. конф. ; 13-й съезд Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков : тез. докл., Минск, 27–29 июня 2018 г. / редкол. : И. Д. Вологовский (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2018. – С. 34.
3. Geschwind, M. D. Prion diseases / M. D. Geschwind // *CONTINUUM: Lifelong Learn. in Neurol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 1612–1638. <https://doi.org/10.1212/CON.00000000000000251>
4. Knight, R. S. G. Prion diseases / R. S. G. Knight, R. G. Will // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* – 2004. – Vol. 75, N 90001. – P. 36–42. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2004.036137>
5. Johnson, R. T. Prion diseases / R. T. Johnson // *Lancet Neurol.* – Vol. 4, N 10. – P. 635–642. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(05\)70192-7](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(05)70192-7)
6. Prusiner, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie / S. B. Prusiner // *Science.* – 1982. – Vol. 216, N 4542. – P. 136–144. <https://doi.org/10.1126/science.6801762>
7. Cooperative structural transitions in amyloid-like aggregation / T. Steckmann [et al.] // *J. Chem. Phys.* – 2017. – Vol. 146, N 13. – P. 135103. <https://doi.org/10.1063/1.4979516>
8. Chou, P. Y. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence / P. Y. Chou, G. D. Fasman // *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* / ed. A. Meister. – New York, 1978. – Vol. 47. – P. 45–148.
9. Стабильность альфа-спиральных и бета-структурных блоков в белках четырех структурных классов / В. В. Побойнев [и др.] // *Вест. Нац. акад. навук. Сер. біял. навук.* – 2018. – Т. 63, № 4. – С. 391–400.
10. Хрусталёв, В. В. Особенности аминокислотного состава бета-тяжей в белках различных структурных классов / В. В. Хрусталёв, В. В. Побойнев, Т. А. Хрусталёва // *Фундаментальная наука в современной медицине : материалы сателл. дистанц. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых (Минск, 3 марта 2017 г.)* / Белорус. гос. мед. ун-т ; под ред. А. В. Сикорского [и др.]. – Минск, 2017. – С. 331–336.
11. The Protein Data Bank / H. M. Berman [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – Vol. 28, N 1. – P. 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
12. Aurora, R. Helix capping / R. Aurora, G. D. Rose // *Protein Sci.* – 1998. – Vol. 7, N 1. – P. 21–38. <https://doi.org/10.1002/pro.5560070103>
13. Khrustalev, V. V. The influence of flanking secondary structures on amino acid content and typical lengths of 3/10 helices / V. V. Khrustalev, E. V. Barkovsky, T. A. Khrustaleva // *Int. J. Proteomics.* – 2014. – Vol. 2014. – Art. ID 360230. <https://doi.org/10.1155/2014/360230>

14. Побойнев, В. В. Особенности аминокислотного состава альфа-спиральных участков в полипептидных цепях белков различных структурных классов / В. В. Побойнев, В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва // Вес. Нац. акад. наук. Сер. біял. навук. – 2017. – № 4. – С. 58–66.
15. Baldwin, R. L. Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states / R. L. Baldwin, G. D. Rose // *Trends Biochem. Sci.* – 1999. – Vol. 24, N 5. – P. 77–83. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(98\)01345-0](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(98)01345-0)
16. Abrusán, G. Alpha helices are more robust to mutations than beta strands / G. Abrusán, J. A. Marsh // *PLoS Comput. Biol.* – 2016. – Vol. 12, N 12. – P. e1005242. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005242>
17. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor / X. Zhang [et al.] // *Cell.* – 2006. – Vol. 125, N 6. – P. 1137–1149. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.013>
18. Dynamics of disulfide-bond disruption and formation in the thermal unfolding of ribonuclease A / P. Krupa [et al.] // *J. Chem. Theory Comput.* – 2017. – Vol. 13, N 11. – P. 5721–5730. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00724>
19. Разработка потенциальных ингибиторов ВИЧ-1 методами in silico клик-химии и молекулярного моделирования / А. М. Андрианов [и др.] // *Мат. биология и биоинформатика.* – 2018. – Т. 13, № 2. – С. 507–525.

References

1. Murzin A. G., Brenner S. E., Hubbard T., Chothia C. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *Journal of Molecular Biology*, 1995, vol. 247, no. 4, pp. 536–540. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80134-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80134-2)
2. Poboinev V. V., Khrustalev V. V., Stozharov A. N., Khrustaleva T. A. Thermodynamic characteristics of stability of the structure of proteins of four classes. *Molekulyarnye, membrannye i kletochnye osnovy funkcionirovaniya biosistem: mezhdunarodnaya nauchnaya konferentsiya; Trinadtsatyi s'ezd Belorusskogo obshchestvennogo ob'edineniya fotobiologov i biofizikov: tezisy dokladov (Belarus', Minsk, 27–29 iyunya 2018 goda)* [Molecular, membrane and cellular bases of the functioning of biosystems: international scientific conference; The thirteenth congress of the Belarusian public association of photobiologists and biophysicists: abstracts of reports (Belarus, Minsk, June 27–29, 2018)]. Minsk, 2018, p. 34 (in Russian).
3. Geschwind M. D. Prion Diseases. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 2015, vol. 6, pp. 1612–1638. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000251>
4. Knight R. S. G., Will R. G. Prion diseases. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 2004, vol. 75, no. 9001, pp. 36–42. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2004.036137>
5. Johnson R. T. Prion diseases. *Lancet Neurology*, vol. 4, no. 10, pp. 635–642. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(05\)70192-7](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(05)70192-7)
6. Prusiner S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 1982, vol. 216, no. 4542, pp. 136–144. <https://doi.org/10.1126/science.6801762>
7. Steckmann T. Y., Bhandari R., Chapagain P. P., Gerstman B. S. Cooperative structural transitions in amyloid-like aggregation. *Journal of Chemical Physics*, 2017, vol. 146, no. 13, p. 135103. <https://doi.org/10.1063/1.4979516>
8. Chou P. Y., Fasman G. D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. New York, 1978, vol. 47, pp. 145–148.
9. Poboinev V. V., Khrustalev V. V., Stozharov A. N., Khrustaleva T. A. Stability of alpha-helical and beta-structural blocks in proteins of four structural classes. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2018, vol. 63, no. 4, pp. 391–400 (in Russian).
10. Khrustalev V. V., Poboinev V. V., Khrustaleva T. A. Features of amino acid composition of beta-strands in proteins of different structural classes. *Fundamental'naya nauka v sovremennoi meditsine: materialy satellitnoi distantsionnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii studentov i molodykh uchenykh (Minsk, 3 marta 2017 goda)* [Fundamental science in modern medicine: materials of the satellite remote scientific-practical conference of students and young scientists (Minsk, March 3, 2017)]. Minsk, 2017, pp. 331–336 (in Russian).
11. Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 2000, vol. 28, no. 1, pp. 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
12. Aurora R., Rose G. D. Helix capping. *Protein Science*, 1998, vol. 7, no. 1, pp. 21–38. <https://doi.org/10.1002/pro.5560070103>
13. Khrustalev V. V., Barkovsky E. V., Khrustaleva T. A. The influence of flanking secondary structures on amino acid content and typical lengths of 3/10 helices. *International Journal of Proteomics*, 2014, vol. 2014, art. ID 360230. <https://doi.org/10.1155/2014/360230>
14. Poboinev V. V., Khrustalev V. V., Khrustaleva T. A. Features of amino acid composition of alpha-helical regions in proteins of different structural classes. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 58–66 (in Russian).
15. Baldwin R. L., Rose G. D. Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states. *Trends in Biochemical Sciences*, 1999, vol. 24, no. 5, pp. 77–83. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(98\)01345-0](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(98)01345-0)
16. Abrusán G., Marsh J. A. Alpha helices are more robust to mutations than beta strands. *PLoS Computational Biology*, 2016, vol. 12, no. 12, p. e1005242. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005242>
17. Zhang X., Gureasko J., Shen K., Cole P. A., Kuriyan J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, 2006, vol. 125, no. 6, pp. 1137–1149. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.013>

18. Krupa P., Sieradzan A. K., Mozolewska M. A., Li H., Liwo A., Scheraga H. A. Dynamics of disulfide-bond disruption and formation in the thermal unfolding of ribonuclease A. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2017, vol. 13, no. 11, pp. 5721–5730. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00724>

19. Andrianov A. M., Nikolaev G. I., Kashin I. A., Tuzikov A. V. Development of potential inhibitors of HIV-1 in silico methods of click-chemistry and molecular modeling. *Matematicheskaya biologiya i bioinformatika* [Mathematical biology and bioinformatics], 2018, vol. 13, no. 2, pp. 507–525 (in Russian).

Информация об авторах

Побойнев Виктор Витольдович – аспирант, ассистент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dremozzew@mail.ru

Хрусталеv Владислав Викторович – доцент, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vvkhrustalev@mail.ru

Хрусталева Татьяна Александровна – ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tanissia.lir@gmail.com

Стожаров Александр Николаевич – профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: stojarov@mail.ru

Information about the authors

Victor V. Poboinev – Postgraduate student, assistant. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskii Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dremozzew@mail.ru

Vladislav V. Khrustalev – Assistant Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskii Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vvkhrustalev@mail.ru

Tatyana A. Khrustaleva – Senior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tanissia.lir@gmail.com

Aliaksandr N. Stazharau – Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynskii Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: stojarov@mail.ru