

DWIE TWARZE STRUKTURY PRZESTRZENNEJ BIAŁEK – ZASTOSOWANIE WIEDZY O BIAŁKACH SAMOISTNIE NIEUPORZĄDKOWANYCH W RACJONALNYM PROJEKTOWANIU LEKÓW

Adam Górka*, Piotr Bonarek

Zakład Biochemii Fizycznej, Wydziału Biochemii Biofizyki i Biotechnologii,
Uniwersytet Jagielloński, Gronostajowa 7, Kraków, Polska
mail: krzysztof.wiercioch@agh.edu.pl

Streszczenie: Białka są podstawowymi składnikami żywych komórek. Prawidłowe rozumienie cech ich struktury przestrzennej jest kluczowe dla zrozumienia ich funkcjonowania w organizmach żywych. Białka mogą przebywać w czterech wyróżnionych stanach organizacji struktury przestrzennej: uporządkowanym, stopionej globuli, pre-stopionej globuli i kłębka statystycznego. Funkcje białek mogą być związane z każdym z tych stanów, a co ważniejsze, z przejściami pomiędzy tymi stanami.

Znacząca liczba białek w przyrodzie zbudowana jest z mieszaniny rejonów uporządkowanych oraz samoistnie nieuporządkowanych, które pełnią ważne role w procesach przekazu sygnału, regulacji cyklu komórkowego i wielu innych. Standardowe podejście do racjonalnego projektowania leków nie sprawdza się w przypadku białek samoistnie nieuporządkowanych (IDPs) i wymaga zmodyfikowanej strategii postępowania. Jednym z atrakcyjnych celów terapeutycznych dla przemysłu farmaceutycznego są krótkie fragmenty łańcucha aminokwasowego pełniące funkcje elementów rozpoznawania molekularnego (MoRFs), które porządkują swoją strukturę w różnorodnych licznych oddziaływaniach z innymi białkami. Charakterystyczną cechą MoRFs-ów jest ich częste występowanie w rejonach samoistnie nieuporządkowanych łańcucha polipeptydowego.

Słowa kluczowe: elementy rozpoznawania molekularnego, oddziaływania białko białko, fałdowanie białek, cechy sekwencji aminokwasowej białek

The two faces of the proteins structure Application of knowledge about intrinsically disordered proteins in rational drug design

Abstrakt: Proteins are an essential component of living cells. Proper understanding of the properties of their structure is crucial to understanding their function in nature. The proteins and their fragments may exist in four states of structure organization: ordered, molten globule, pre molten globule and random coil. The particular function of proteins depend on any one of these states or a transition between them. A significant proportion of proteins in nature is composed of a mixture of ordered and intrinsically disordered regions, that fulfil important roles in the processes like signal transduction, cell cycle regulation and many others. The standard approach for rational drug design does not work for intrinsically disordered proteins (IDPs) and requires modified strategies. Furthermore, the majority of proteins with long intrinsically disordered regions (IDRs) use short molecular recognition elements (MoRFs), which undergo transition from disorder to order state and adopt various structures in numerous protein protein interactions. These interactions are an attractive therapeutic target for the pharmaceutical industry in the process of rational drug design.

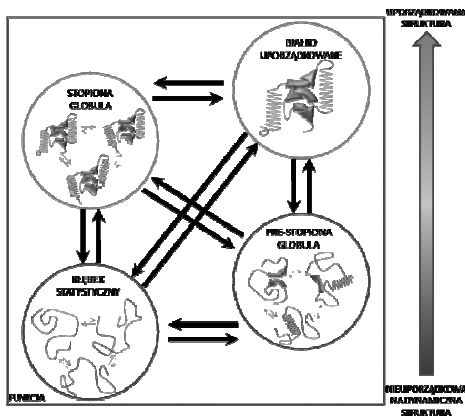
Keywords: molecular recognition features, protein protein interactions, protein folding, amino acid sequence properties of proteins.

Białka, długie polikondensaty aminokwasów, są jednymi z głównych składników organizmów żywych. Ich

struktura przestrzenna determinowana jest, po pierwsze, przez sekwencję budujących je stosunkowo nielicznych, bo dwudziestu reszt aminokwasowych, o różnych

właściwościach. Z kolei wewnątrz łańcuchowe oddziaływania aminokwasów w białku określają, które struktury drugorzędowe są lokalnie preferowane przez dany fragment łańcucha polipeptydowego. Drugim czynnikiem, który determinuje strukturę przestrzenną białek, jest środowisko, w którym występują. To, jakie oddziaływania z otoczeniem są możliwe, ma ogromny wpływ na ich strukturę przestrzenną. Należy zwrócić uwagę na fakt, iż w różnych przedziałach komórkowych panują odmienne warunki środowiska. Nawet subtelne różnice w składzie i stężeniach współwystępujących białek, jonów, ko-faktorów mogą mieć znaczenie, dlatego struktura przestrzenna danego białka w każdym z nich może być nieco inna. Struktura przestrzenna łańcucha polipeptydowego może być organizowana na dwa przeciwstawne sposoby: uporządkowany i samoistnie nieuporządkowany. W pierwszym przypadku, wartości kątów Ramachandrana w łańcuchu polipeptydowym i położenia łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych ulegają nieizotropowym, oscylującym zmianom o niskich amplitudach w swoim lokalnym sąsiedztwie. Są też charakteryzowane poprzez równowagowe położenia atomów definiowane jako ich średnie wartości liczone po czasie. Zmiany w położeniach atomów powodowane są przez ruchy termiczne i niewielkie kooperatywne zmiany konformacyjne w lokalnym sąsiedztwie łańcucha polipeptydowego.

function.

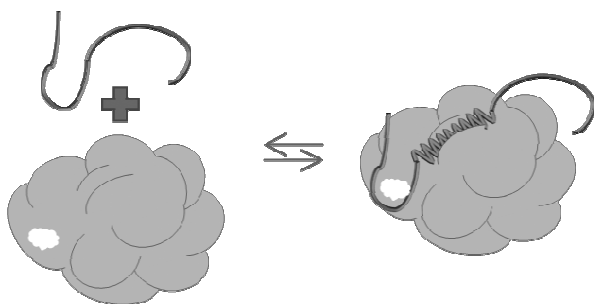


Rysunek 1. Model kwartetu białkowego. Białka w przyrodzie mogą występować w czterech stanach konformacyjnej organizacji struktury przestrzennej: w stanie kłębka statystycznego, pre-stopionej globuli, stopionej globuli i w stanie uporządkowanym. Każdy z nich może być stanem natywnym białka lub jego rejonu. Pojedyncza funkcja białka może wynikać z któregośkolwiek z tych stanów, a co więcej z dowolnego z przejść pomiędzy nimi [2].

Natomiast nieuporządkowany łańcuch polipeptydowy ulega przypadkowym szybkim przejściom pomiędzy wieloma różnymi konformacjami, które może przyjąć, tworząc dynamiczną strukturalną całość. W przypadku takiej organizacji struktury przestrzennej pozycje atomów i wartości kątów Ramachandrana łańcucha polipeptydowego zmieniają się w czasie, bez konkretnych równowagowych wartości. To, który z tych sposobów będzie dominował w strukturze przestrzennej danego białka zależy od stosunku wypadkowego ładunku łańcucha polipeptydowego i jego hydrofobowości. Oddziaływania hydrofobowe i zjawisko kolapsu hydrofobowego jest odpowiedzialne za porządkowanie struktury przestrzennej białka, natomiast elektrostatyczne odpychające oddziaływania jednoimiennie naładowanych grup bocznych aminokwasów są przyczyną, dla której łańcuch polipeptydowy pozostaje samoistnie nieuporządkowany [1]. Całe kontinuum możliwych sposobów organizacji struktury przestrzennej łańcucha polipeptydowego, przedstawione na rysunku 1., możemy podzielić zasadniczo na cztery stany, w kolejności malejącego nieuporządkowania: stan kłębka statystycznego, pre stopionej globuli, stopionej globuli i stan uporządkowany. Każdy z wymienionych stanów białka może być jego stanem natywnym, co więcej w czasie swojego istnienia może ono natywnie przyjmować więcej niż jeden stan organizacji struktury przestrzennej. Kluczowym aspektem modelu kwartetu białkowego jest fakt, iż pojedyncza funkcja białka może wynikać z któregośkolwiek z tych stanów, a także z dowolnego z przejść pomiędzy tymi stanami [2]. Białka, których łańcuch polipeptydowy w przeważającej części pozostaje nieuporządkowany nazywamy białkami samoistnie nieuporządkowanymi (intrinsically disordered proteins, IDPs) [3]. Nieustające zmiany struktury przestrzennej samoistnie nieuporządkowanego łańcucha peptydowego są zazwyczaj niekooperatywne i przypadkowe. Takie zachowanie łańcucha aminokwasowego nie wyklucza jednak istnienia i pojawiania się lokalnie nietrwałych struktur drugorzędowych i topologii przestrzennych. Fluktuują one powstając i rozpadając się w warunkach braku stabilizujących je oddziaływań. Ich chwilowe występowanie jest jednak kluczowe dla pełnienia wielu biologicznie istotnych funkcji przez białka o samoistnie nieuporządkowanej strukturze. Rejony o uporządkowanej strukturze odpowiadają przede wszystkim za aktywność enzymatyczną białek, pełnią również rolę elementów strukturalnych organizmów żywych, tworzą wiele podjednostkowe kompleksy lub elementy transbłonowe. W odróżnieniu od nich rejony o samoistnie nieuporządkowanej strukturze pełnią głównie funkcje rozpoznawania

molekularnego, przekazywania sygnałów i stanowią miejsca potranslacyjnych modyfikacji [4]. Każde białko podczas biosyntezy na rybosomie powstaje w formie kłębka statystycznego. W trakcie lub po zakończeniu translacji może ono ulec zwinięciu i przyjąć dobrze zdefiniowaną uporządkowaną strukturę przestrzenną lub pozostać w stanie samoistnego nieuporządkowania. Proces fałdowania białka często jest stowarzyszony z potranslacyjnymi modyfikacjami, transportem do innych kompartmentów komórkowych, wiązaniem ligandów i kofaktorów. Każde z tych zdarzeń może mieć istotne znaczenie dla prawidłowego fałdowania białka i przyjmowanej przez niego struktury przestrzennej.

Białka pełnią wiele funkcji oddziałując i tworząc kompleksy z innymi białkami. Klasycznie takie oddziaływanie wyobrażamy sobie jako łączenie się w całość co najmniej dwóch białek o dobrze zdefiniowanej komplementarnej strukturze przestrzennej, jak w przypadku kompleksów tworzonych przez białka globularne. Uporządkowane kompleksy potrafią tworzyć również białka, które po translacji pozostają samoistnie nieuporządkowane i dopiero po spotkaniu swojego molekularnego partnera ulegają wraz z nim wspólnemu fałdowaniu i razem przybierają ściśle zdefiniowaną strukturę przestrzenną [5]. IDPs bardzo często wiążą się także do uporządkowanych białek. Mechanizm takiego oddziaływania, przedstawiony na rysunku 2., polega na strukturyzacji jednego lub kilku krótkich odcinków sekwencji aminokwasowych, nazywanych elementami molekularnego rozpoznawania (Molecular recognition features, MoRFs), znajdujących się wewnątrz długich nieuporządkowanych rejonów (Intrinsically disordered regions, IDR) [5, 6].



Rysunek 2. Schemat wiązania się MoRFs do jego partnera molekularnego. IDPs wykorzystują jeden lub kilka krótkich odcinków sekwencji aminokwasowych wewnątrz długich rejonów

nieuporządkowanych, których struktura ulega porządkowaniu podczas wiązania najczęściej do rowka w powierzchni partnera

Kompleksy powstałe w taki sposób często posiadają flankujące lub spinające rejony o nieuporządkowanej strukturze [7]. Co ważne, jeden MoRF może wiązać wiele różnych partnerów, na różne sposoby. MoRFs w kompleksach mogą przybierać różne formy struktur drugorzędowych: □ helikalne, arkusze □, nieregularne lub ich kombinacje. MoRFs można skutecznie identyfikować na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej [6]. Trwają prace nad stworzeniem automatycznych algorytmów przewidujących rodzaje tworzonych struktur drugorzędowych [8]. Wiązanie MoRFs do ich partnerów charakteryzuje się wysoką specyficznością, ale niskim powinowactwem [5].

W literaturze opisano również bardziej skomplikowane mechanizmy oddziaływania białek samoistnie nieuporządkowanych. Przykładem jest dziewięciokrotnie fosforyzowane białko Sic1, którego każda reszta fosforanowa jest potencjalnym miejscem wiązania białka cdc4. Te równo cenne motywy wiążące konkurują ze sobą o miejsce wiązania w uporządkowanym partnerze, tak, że w danej chwili, tylko jeden z nich jest trwale związany. Powstaje kompleks w dynamicznym stanie równowagi, stabilizowany przez słabe, daleko zasięgowe oddziaływania elektrostatyczne wszystkich reszt fosforanowych z kieszenią wiążącą [5].

Istnienie kilku podobnych miejsc wiążących w połączeniu z giętką i dynamiczną strukturą IDPs stwarza unikalną sytuację, gdzie każde miejsce wiązania w białku może oddziaływać z każdym potencjalnym motywem wiążącym partnera, z prawie równym prawdopodobieństwem. Niskie powinowactwo każdego oddziaływania z osobna sprawia, że nie są one trwałe i ulegają częstemu rozpadowi i odtwarzaniu. Dlatego też takie „rozmyte kompleksy” o nieuporządkowanej strukturze, należy sobie wyobrażać jako bardzo dynamiczne zespoły oddziaływań, w których pojedyncze białko nie prezentuje partnerowi jednego miejsca wiązania, lecz raczej przypomina chmurę wiążących oddziaływań [5, 9].

W racjonalnym projektowaniu leków na podstawie zgromadzonych informacji o funkcji białek i kwasów nukleinowych w procesach biologicznych dokonuje się

selekcji potencjalnych celów terapeutycznych. Celem terapeutycznym najczęściej są białka, kwasy nukleinowe, błony komórkowe oraz ich kompleksy, na które, poprzez hamowanie lub wzmacnianie określonej aktywności biologicznej działa dany lek. Znajomość struktury przestrzennej celu terapeutycznego pozwala na wykorzystanie metod modelowania molekularnego w projektowaniu leków. Powyższa strategia jest dobrze ugruntowana i powszechnie stosowana w przemyśle farmaceutycznym i sprawdza się w przypadku białek o dobrze uporządkowanej strukturze [10].

Opracowywanie cząsteczek wymierzonych w IDPs wymaga stworzenia nowych i modyfikacji obecnie dostępnych technik racjonalnego projektowania leków. Można w tym celu z powodzeniem wykorzystać zgromadzoną wiedzę o IDPs, które z uwagi na dynamiczny charakter organizacji struktury przestrzennej „nie lubią” krystalizować. W szczególności występujące w IDPs MoRFs, mają ogromne znaczenie biologiczne, występujące powszechnie w proteomach eukariontów, często biorące udział w patogenezie wielu chorób, nadają się idealnie na cele terapeutyczne [6, 8].

Zidentyfikowane MoRFs w potencjalnym celu terapeutycznym mogą posłużyć do identyfikacji i izolacji jego partnerów molekularnych. Później można poddać krystalizacji znalezione kompleksy i wykorzystać poznaną strukturę w tradycyjnym, racjonalnym projektowaniu leków. Co więcej, podczas wiązania do białka MoRFs część energii jest wykorzystana do porządkowania ich struktury. Z tego powodu, zaprojektowana cząsteczka leku, już dopasowana konformacyjnie do miejsca wiążącego powinna oddziaływać silniej niż naturalny ligand [8].

Obecnie istnieją co najmniej dwie strategie wykorzystujące zgromadzoną wiedzę o IDPs i MoRFs. Idea obu opiera się na blokowaniu wiązania MoRF z kieszenią wiążącą ich uporządkowanego partnera. Pierwsza z tych strategii polega na projektowaniu cząsteczki naśladowującej strukturę przestrzenną MoRF w kompleksie z jego uporządkowanym partnerem. Podejście to w dużej mierze bazuje na klasycznej strategii racjonalnego projektowania leków, gdyż koncentruje się na znajomości struktury przestrzennej kompleksu MoRF z jego uporządkowanym partnerem i mimikrze struktury przestrzennej krótkiego peptydu reprezentującego MoRF [4, 8, 11, 12]. Cząstka taka ma za zadanie wiązać się silniej niż IDP do uporządkowanego partnera blokując lub wywołując określoną aktywność biologiczną. Jako przykład można przytoczyć zaprojektowaną cząsteczkę blokującą oddziaływanie białek Mdm2 i p53. Mdm2 blokuje aktywność p53 w procesie supresji nowotworowej. Stworzona cząsteczka o potencjale

lecniczym naśladuje kształtem MoRF białka p53, odpowiadającego za wiązanie do białka MDM2 i silniej niż naturalny ligand z nim oddziałuje. Stopień dopasowania strukturalnego do miejsca wiązania w MDM2 syntetycznej cząsteczki jest mniejszy, ale brak konieczności porządkowania jej struktury powoduje, że sumarycznie entalpia swobodna wiązania jest dla niej znacząco niższa. Ten przykład wskazuje, że nieuporządkowanie łańcucha polipeptydowego MoRF może być kluczowe, aby zaprojektować cząsteczkę, która będzie od niego silniej wiązana [8, 13].

Drugie podejście skupia się bezpośrednio na IDRs wewnątrz których znajdują się MoRFs. Polega na projektowaniu cząsteczek, które specyficznie wiążąc się do określonych sekwencji IDRs, wymuszają w nich sztuczne uporządkowanie struktury przestrzennej (miejscową denaturację takiego rejonu) i uniemożliwiają tym samym utworzenie kompleksu [12]. Dobrym przykładem takiego celu terapeutycznego jest białko c myc, gdyż ulega ono nadekspresji w wielu ludzkich nowotworach i reguluje dużą liczbę ważnych genów oraz procesów w komórce. Białko to heterodimeryzuje z białkiem Max. Oba białka w niezwiązanej formie są samoistnie nieuporządkowane, a ich struktura ulega uporządkowaniu podczas tworzenia heterodimeru. Opracowano kilkanaście cząsteczek blokujących dimeryzację tych dwóch białek. Charakteryzują je jednak niskie powinowactwo i słaba specyficzność, gdyż oddziałują średnio z 6 innymi białkami. Opracowanie sposobu zwiększanie specyficzności i powinowactwa takich cząsteczek jest wyzwaniem dla dalszego rozwoju metod projektowania leków celujących w IDRs [12, 13].

Samoistne nieuporządkowanie struktury przestrzennej białek jest powszechne zarówno w ludzkim jak i w pozostałych eukariotycznych proteomach. Pełni ono wiele ważnych funkcji na szlakach przekazu sygnału i w procesie kontroli cyklu komórkowego. Stąd wiele białek powiązanych z różnymi patologicznymi procesami w komórkach posiada IDRs. Zastosowanie metod obliczeniowych opartych o wiedzę o białkach samoistnie nieuporządkowanych stanowi nowe podejście w racjonalnym projektowaniu nowych leków. W szczególności oddziaływanie białko białko wykorzystujące przejście ze stanu samoistnie nieuporządkowanego do uporządkowanego stanowią doskonałe cele terapeutyczne. To nowe spojrzenie na racjonalne projektowanie leków powinno w przyszłości zaowocować opracowaniem nowych cząsteczek kandydatów do miana leku [4, 8, 11–13].

Literatura

1. Ashbaugh HS, Hatch HW: Natively unfolded protein stability as a coil to globule transition in charge/hydrophathy space. *Journal of the American Chemical Society* 2008, 130:9536–9542.
2. Uversky VN: Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein science : a publication of the Protein Society* 2002, 11:739–756.
3. Uversky VN, Dunker a K: Understanding protein non folding. *Biochimica et biophysica acta* 2010, 1804:1231–1264.
4. Uversky VN: Intrinsically disordered proteins from A to Z. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2011, 43:1090–1103.
5. Uversky VN: Multitude of binding modes attainable by intrinsically disordered proteins: a portrait gallery of disorder based complexes. *Chemical Society reviews* 2011, 40:1623–1634.
6. Vacic V, Oldfield CJ, Mohan A, Radivojac P, Cortese MS, Uversky VN, Dunker AK: Characterization of molecular recognition features, MoRFs, and their binding partners. *Journal of proteome research* 2007, 6:2351–2366.
7. Mittag T, Kay LE, Forman Kay JD: Protein dynamics and conformational disorder in molecular recognition. *Journal of molecular recognition : JMR* 2010, 23:105–116.
8. Cheng Y, LeGall T, Oldfield CJ, Mueller JP, Van Y YJ, Romero P, Cortese MS, Uversky VN, Dunker a K: Rational drug design via intrinsically disordered protein. *Trends in biotechnology* 2006, 24:435–442.
9. Tompa P, Fuxreiter M: Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein protein interactions. *Trends in biochemical sciences* 2008, 33:2–8.
10. Mandal S, Moudgil M, Mandal SK: Rational drug design. *European journal of pharmacology* 2009, 625:90–100.
11. Wang J, Cao Z, Zhao L, Li S: Novel Strategies for Drug Discovery Based on Intrinsically Disordered Proteins (IDPs). *International journal of molecular sciences* 2011, 12:3205–19.
12. Metallo SJ: Intrinsically disordered proteins are potential drug targets. *Current opinion in chemical biology* 2010, 14:481–488.
13. Dunker a K, Uversky VN: Drugs for “protein clouds”: targeting intrinsically disordered transcription factors. *Current opinion in pharmacology* 2010, 10:782–788.

