

doi: 10.3969/j.issn.1007-2861.2012.02.013

α -synuclein 蛋白与 A- β 肽和 β -synuclein 蛋白 相互作用位点的预测

王群群¹, 答亮², 王翼飞¹

(1. 上海大学 理学院, 上海 200444; 2. 中国科学院 上海生命科学研究院, 上海 200031)

摘要: α -synuclein 蛋白的异常聚集是引起帕金森病的重要因素. 实验研究发现, α -synuclein 蛋白能与多个蛋白相互作用. 在相互作用的蛋白质中, 有的可以促进 α -synuclein 的异常聚集, 如 A- β 肽; 有的可以抑制 α -synuclein 的异常聚集, 如 β -synuclein 蛋白, 但促进或抑制 α -synuclein 异常聚集的机理并不明确. 利用 SYBYL 和 AUTODOK 软件模拟 α -synuclein 蛋白与 A- β 肽和 β -synuclein 的相互作用, 找到其相互作用位点, 为进一步研究 α -synuclein 蛋白的异常聚集提供理论依据.

关键词: α -synuclein 蛋白; A- β 肽; β -synuclein 蛋白; 同源建模; 分子对接; 活性位点

中图分类号: Q 81

文献标志码: A

文章编号: 1007-2861(2012)02-0178-05

Prediction of α -synuclein with A- β Peptide and β -synuclein Interaction Sites

WANG Qun-qun¹, DA Liang², WANG Yi-fei¹

(1. College of Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China;

2. Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: The abnormal aggregation of α -synuclein plays an essential role in the Parkinson's disease. A recent study demonstrates the α -synuclein may interact with many different proteins such as A- β peptide and β -synuclein. A- β peptide promotes abnormal aggregation of α -synuclein. However, β -synuclein is resistant to α -synuclein accumulation. The mechanism of promotion or inhibition of the aggregation is not yet clear. We simulate the interaction of α -synuclein with A- β peptide and β -synuclein, and predict the interaction binding sites. The paper provides theoretical evidence for further research of abnormal aggregation.

Key words: α -synuclein; A- β peptide; β -synuclein; homology modeling; molecule docking; active site

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见于中老年人群的神经系统变性疾病,大多在60岁以后发病,其患者主要表现为动作缓慢,手脚或其他部位的震颤,身体失去柔软性,变得僵硬.帕金森

病在 ≥ 65 岁的人群中,患病的比例为1%,在 > 40 岁的人群中则为0.4%,也可在儿童期或青春期发病.帕金森病随着年龄的增加,发病率也逐渐增加.据统计,我国每年新增帕金森病患者多达10万

收稿日期:2011-03-14

基金项目:国家科技重大专项资助项目(2009ZX09103-686);国家自然科学基金资助项目(30971480);上海市重点学科建设资助项目(S30104);上海市教委重点学科建设资助项目(J50101)

通信作者:王翼飞(1948~),男,教授,博士生导师,研究方向为计算分子生物学. E-mail:yifei_wang@staff.shu.edu.cn

人^[1]. 目前,人们对帕金森病的病因不是很明了,还不能从根本上治疗,因此,深入研究帕金森病的发病机理尤其重要.

α -synuclein 基因是最早发现的与帕金森病相关的基因,它定位于 4q21—q23,属染色体显性遗传,且 α -synuclein 蛋白是一种前突触蛋白,主要在神经组织中表达. 研究发现,不论是家族性还是散发性帕金森病, α -synuclein 都是特征性包涵体-Lewy 小体的重要组成部分^[2,4]. α -synuclein 的异常聚集与肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis)、帕金森病 (Parkinson's disease)、多系统萎缩 (multiple system atrophy) 和路易体痴呆 (dementia with Lewy bodies) 等疾病有着密切关系^[5]. α -synuclein 能与多种蛋白质相互作用,有些蛋白质能促进 α -synuclein 的聚集,如 synphilin-1 蛋白、微管蛋白、A- β 肽、FK506 结合蛋白等;也有些蛋白质能抑制 α -synuclein 的异常聚集,如膜联蛋白 A5、HSP70、DJ-1、 β -synuclein 蛋白等^[6]. 本工作从分子结构学角度出发,模拟了 α -synuclein 分别与 A- β 肽和 β -synuclein 的相互作用情况,找出相互作用位点,为进一步研究促进或抑制 α -synuclein 异常聚集的关键位点提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

本研究中, α -synuclein 和 A- β 肽的结构数据从 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) 中获取,其中 PDB 编号分别为 1XQ8 和 1IYT. β -synuclein 的结构目前未知,我们从 uniprot 数据库 (<http://www.uniprot.org>) 下载得到它的序列信息,其编号为 Q16143. 本研究使用的软件包主要为 SYBYL 8.0 (Tripos 公司,美国) 和 AUTODOCK 4.0 等.

α -synuclein 由 140 个氨基酸组成,相对分子量为 14 460 Da,正常情况下在溶液中以无规卷曲的形式存在,在膜或脂情况下,会形成部分螺旋结构. α -synuclein 包括 3 个不同的区域:① 两亲区域,由 N 端的 1—60 残基组成;② NAC 片段,由残基 61—95 组成,该区域由许多疏水性氨基酸残基组成,是 α -synuclein 区别于其他家族蛋白如 β -synuclein 蛋白和 γ -synuclein 蛋白的重要特征区域,在 α -synuclein 形成纤维的过程中起重要作用;③ 酸性氨基酸区域由 C 末端 96—140 残基组成^[7,8].

淀粉样 β 蛋白 (amyloid beta protein, A- β) 是阿尔茨海默症 (Alzheimer disease, AD) 患者脑中斑块

的核心蛋白,由淀粉样蛋白前体 (amyloid protein precursor, APP) 经过不同酶 (α , β , γ 分泌酶) 在不同位点剪切而成,其中 A- β 40 和 A- β 42 为主要组成成分^[9-11]. 实验证明, A- β 42 比 A- β 40 更容易促进 α -synuclein 聚集^[12], 因此,本工作研究 A- β 42 和 α -synuclein 的相互作用.

人体的 β -synuclein 由 134 个氨基酸残基组成,与 α -synuclein 有 59% 的同源性,主要在脑中表达. 在体外, β -synuclein 与 α -synuclein 共同孵育可以明显抑制 α -synuclein 纤维的形成^[13].

1.2 方法

1.2.1 预处理

由于直接从 PDB 数据库中获得的蛋白质结构数据存在不合理的碰撞和张力的,所以,在分子对接之前要对其进行预处理. 在 SYBYL 8.0 中,分别对 α -synuclein 和 A- β 肽进行加全氢、加 Kollman_all 电荷、能量最小化处理后,将其保存为 mol2 格式.

1.2.2 同源建模

由于 β -synuclein 的分子结构目前尚未知,所以,我们首先模建出 β -synuclein 的结构模型. 同源建模是预测蛋白质三维结构的最常用的方法,其原理是依据已知结构的同源蛋白建立目标蛋白的结构模型. 当 2 个蛋白的序列同源性大于 30% 时,便可以应用同源建模的方法模建未知的蛋白结构,其中序列的同源性越高,模建结构的准确性越高.

β -synuclein 与人体 α -synuclein 蛋白的序列同源性达 59%, 因此,本工作以 α -synuclein 为模板来模建 β -synuclein 的结构. 首先,在 SYBYL 8.0 的 FUGUE 模块中,将 α -synuclein 与 β -synuclein 的序列进行匹配,确定 β -synuclein 的保守区域和环区;然后,拷贝匹配的残基坐标到 β -synuclein,采用经验性方法模建环区;最后,加侧链,能量最小化优化整个模型^[14]. 模型的合理性在 <http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/> 上评价.

1.2.3 分子对接

分子对接 (molecular docking) 是分子模拟的重要方法之一,是把配体分子放在受体活性位点的位置,按照几何互补、能量互补以及化学环境互补的原则,来评价受体和配体相互作用的好坏,并找出两个分子之间的最佳模式.

目前分子对接的软件有多种,本工作使用 AUTODOCK 4.0 把 α -synuclein 作为受体分别与配体 A- β 肽和配体 β -synuclein 进行半柔性对接. 我们

设定配体 A- β 肽和 β -synuclein 可以自由旋转的键的个数分别为 2 和 4, 以受体为中心, 用围绕受体中心的氨基酸残基形成一个合适的盒子. α -synuclein 与 A- β 肽对接时, 盒子大小选为 50 nm \times 126 nm \times 50 nm; α -synuclein 与 β -synuclein 对接时, 盒子大小选为 64 nm \times 126 nm \times 64 nm. 格点间距均为 1.000 nm. 用不同类型的原子作为探针进行扫描, 计算格点能量. 运用 Lamarchian 遗传算法对配体在盒子范围内进行构象搜索, 以半经验函数作为能量打分函数, 根据配体的不同构象、位置、方向及能量进行评分, 并对结果进行排序. 选取 10 次对接实验中结合能最低的构象为最佳对接构象来进行分析.

2 结果与讨论

2.1 序列联配及同源建模结果

以 α -synuclein 为模板建模 β -synuclein 的结构, 其中 α -synuclein 与 β -synuclein 的序列相似性比对结果如图 1 所示. 经过能量最小化和分子动力学模拟后, 可以得到 β -synuclein 的三维结构模型. β -synuclein 的结构与模板 α -synuclein 的结构有很大的相似性, 主要的不同在残基 LYS85-LYS94 之间, 即 α -synuclein 的 NAC 片段间, 而这一片段也正是 α -synuclein 区别于 β -synuclein 的重要特征区域. 在网站 <http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES> 上在线检验建立的模型, 该网站上的结构分析和检验服务器可以从 PROCHECK, WHAT_CHECK, ERRAT, VERIFY_3D 和 PROVE 方面检验模型的合理性. 将建模好的分子模型提交, 得到检验结果, 图 2 为 PROCHECK 中得到的 Ramachandran 图, 对 Ramachandran 图的分析见表 1. 从图 2 和表 1 可以看到, 主链二面角 ϕ, ψ 落入最佳区域的残基有 79.3%, 落入其他许可区域的残基有 12.6%, 落入勉强许可区的残基有 5.4%, 落入不允许区的残基有 2.7%. 因此, 建模所得的三维结构是合理可信的.

	1	11	21	31	41
α -syn	NDVFMKGLSKAKREGVVA	AAERTKQGVAAEAGK	TKREGVLYVGSK	TKREGVWV	
β -syn	NDVFMKGLSKAKREGVVA	AAERTKQGVAAEAGK	TKREGVLYVGSK	TKREGVWV	
	51	61	71	81	91
α -syn	GVATVAEKTRKQVWV	INVGGAIVTGT	VAQKTVKAGS	IAAATGIVKRNQI	
β -syn	GVASVAEKTRKQASHL	GGAVFSGAGNIA	-----	AAITGLVKREFFETDLEP	
	101	111	121	131	
α -syn	GKNEGKIPQEG	LEDMFVDPINEAYEM	SEEGYQDYEP	EA	
β -syn	EVVQEAABEPLLEP	-----	MEPEGESYEDFPQEEYQDYEP	EA	

图 1 β -synuclein 与 α -synuclein 的序列比对

Fig. 1 Comparison of sequence alignments between β -synuclein and α -synuclein

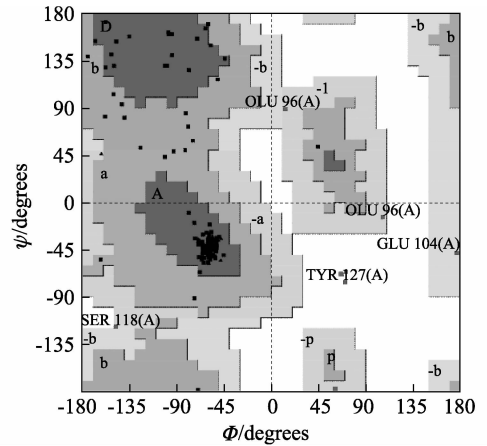


图 2 β -synuclein 蛋白建模结构 Ramachandran 图
Fig. 2 Ramachandran plot of the modeled structure of β -synuclein protein

表 1 Ramachandran 图的分析

Table 1 Analysis of Ramachandran plot

区域	残基数目	百分比/%
最佳区域	88	79.3
其他许可区域	14	12.6
勉强许可区	6	5.4
不允许区域	3	2.7

2.2 分子对接结果及分析

采用分子柔性对接软件 AUTODOCK 4.0 预测 α -synuclein 与 A- β 多肽和 β -synuclein 的对接情况. 该软件能自动将配体对接到受体的活性中心或结合部位, 并利用遗传算法寻找合适的结合构象, 使得配体和受体的形状及其相互作用的匹配效果达到最佳的稳定状态, 形成合理的复合物结构.

在 AUTODOCK 4.0 中分别对 α -synuclein 与 A- β 多肽、 α -synuclein 与 β -synuclein 做 10 次对接, 并分别选取结合能量最小的一组, 提取配体的结构信息, 与受体合成复合物, 并在 SYBYL 8.0 中对复合物进行分析. α -synuclein 与 A- β 多肽的 10 次对接中, 结果最好的是第 1 次, 结合能为 +155 J/mol. α -synuclein 与 β -synuclein 对接结果最好的是第 3 次, 结合能为 +29 J/mol.

图 3 是受体表面化的 α -synuclein 分别与 A- β 多肽和 β -synuclein 对接的复合物结构图, 受体 α -synuclein 用黑色带状表示, 配体 A- β 多肽和 β -synuclein 用黑色平滑线状表示, 其中黑色部分表示计算机预测出来的与配体相互作用的区域, 白色部分表示附近相关作用区域. 图 4 和图 5 是复合物的

氢键连接图,其中图 5 为三维立体图,受体用黑、灰、白 3 种颜色棍状表示,黑色代表与配体相互作用残基,灰色代表附近相关残基,白色表示较远残基.配体 A- β 多肽和 β -synuclein 用白色球棍状表示.由图 3(a)可以看出,A- β 多肽嵌入 α -synuclein 靠近 N 端的较大空腔内,受体相互作用位点的相关残基为 N 端的 22—34 及 NAC 区的 80—91.从图 4 可以看出,受体的残基 GLY84,THR33 分别与配体 A- β 多肽的残基 LYS28,ASP1 之间有氢键连接.这与以前研究^[15]中得出的结果 α -synuclein 的氨基酸残基 81—95 与 A- β 多肽的相互作用是相符合的.

从图 3(b)可以看出, α -synuclein 与 β -synuclein 的异二聚体复合物形成稳固的环状,这从几何形状上较好地解释了 β -synuclein 抑制 α -synuclein 的异常聚集.受体和配体的相互作用区域分为 3 部分,分别是受体 N 端的残基 6—36 和配体 C 端的残基 96—117,受体的残基 94—100 和配体的残基 83—88,受体 C 端的残基 118—128 和配体的残基 42—52.如图 5(a)所示,配体的残基 GLU115 和受体的残基 GLY36, GLU35 之间有氢键连接,配体的残基 GLU113 和受体的残基 LYS34 之间有氢键连接.如图 5(b)所示,配体的残基 THR44, TRU45 分别和受体的残基 THR125, ASN122 之间有稳定的氢键连接.

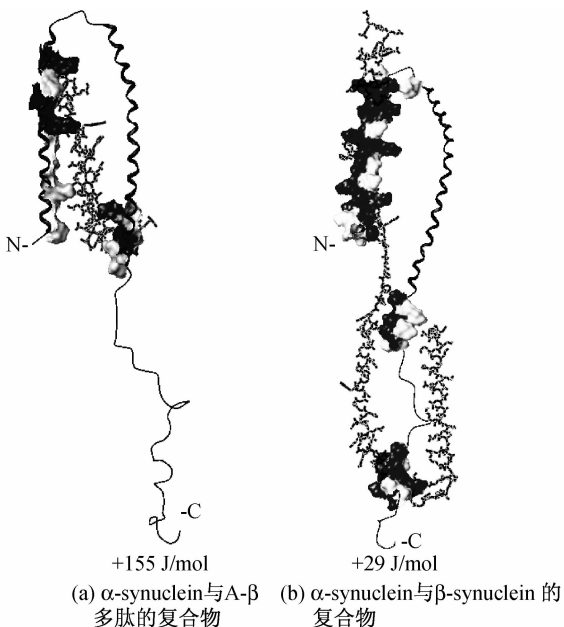


图 3 受体表面化后的 α -synuclein 分别与 A- β 多肽和 β -synuclein 对接的复合物结构

Fig. 3 Complex structure of α -synuclein which generates a MOLCAD surface and A- β , β -synuclein

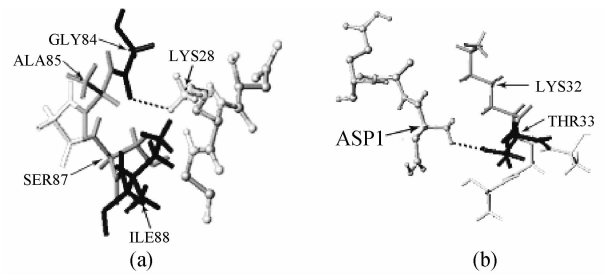


图 4 α -synuclein 蛋白(黑色、灰色、白色,棍型)与 A- β 多肽(白色,球棍型)氢键作用的示意图

Fig. 4 Hydrogen bond interactions between α -synuclein protein (black, gray and white, capped sticks) and A- β (white, ball & stick)

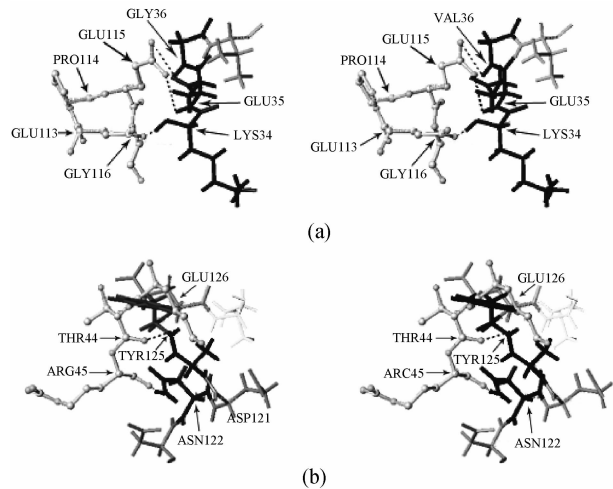


图 5 α -synuclein 蛋白(黑色、灰色、白色,棍型)与 β -synuclein 蛋白(白色,球棍型)氢键作用的三维立体示意图

Fig. 5 3D stereograph of hydrogen bond interactions between α -synuclein protein (black, gray and white, capped sticks) and β -synuclein protein A- β (white, ball & stick)

3 结束语

我们已经明确知道, α -synuclein 蛋白的异常聚集与包括帕金森病的多种神经系统变性疾病有关,而 A- β 多肽与 β -synuclein 在 α -synuclein 的异常聚集中分别起促进和抑制的作用.本工作采用 SYBYL 8.0 的 FUGUE 模块,以 α -synuclein 的结构为模板,采用同源建模的方法建模了 β -synuclein 的结构.由于 α -synuclein 与 β -synuclein 的序列相似性较高,建模的结果可信度较高.为了进一步分析蛋白的相互作用情况,找出关键残基,本工作在 AUTODOCK 4.0

中模拟了 α -synuclein 与 A- β 多肽、 α -synuclein 与 β -synuclein 的相互作用情况. 通过对接发现, α -synuclein 与 2 种蛋白的相互作用位点是不同的, A- β 多肽与 α -synuclein 的 NAC 段有相互作用, 而 β -synuclein 与 α -synuclein 的 NAC 段并没有明显的作用. 已有研究发现, α -synuclein 的 NAC 段是引起异常聚集的重要区域, 其中 α -synuclein 的残基 THR33 和 GLY84 有可能成为促进异常聚集的关键残基, 而残基 LYS34, GLU35, GLY36, THR125, ASN122 有可能成为抑制异常聚集的关键残基. 该结论需要进一步的实验研究进行验证. 通过了解 α -synuclein 和促进或抑制它聚集的不同蛋白的相互作用位点, 设计抑制其异常聚集的药物是我们今后研究的主要方向.

参考文献:

- [1] 黄俊. 帕金森病的研究进展[J]. 中国当代医药, 2010, 17(34):15-16.
- [2] GOEDERT M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases [J]. Nature Reviews Neuroscience, 2001, 2(7):492-501.
- [3] GEORGE J M. The synucleins [J]. Genome Biol, 2002, 3(1):1-6.
- [4] SPILLANTINI M G, SCHMIDT M L, LEE V M, et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies [J]. Nature, 1997, 388(6645):839-840.
- [5] JELLINGER K A. Olfactory bulb alpha-synuclein opathy has high specificity and sensitivity for Lewy body disorders [J]. Acta Neuropathol, 2009, 117(2):215-216.
- [6] 曹赞霞, 王吉华. 促进与抑制 α -synuclein 蛋白异常聚集的相互作用蛋白质[J]. 生物物理学报, 2010, 26(9):783-789.
- [7] PANKRATZ N, NICHOLS W C, ELSAESSER V E, et al. Alpha-synuclein and familial Parkinson's disease [J]. Mov Disorders, 2009, 24(8):1125-1131.
- [8] SCHAPIRA A H. Etiology and pathogenesis of Parkinson disease [J]. Neurol Clin, 2009, 27(3):583-603.
- [9] KANG J, LEMAIRE H G, UNTERBECK A, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor [J]. Nature, 1987, 325(6106):733-736.
- [10] TANZI R E, GUSELLA J F, WATKINS P C, et al. Amyloid β protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus [J]. Science, 1987, 235(4791):880-884.
- [11] SHOJI M, GOLDE T E, GHISO J, et al. Production of the Alzheimer amyloid β protein by normal proteolytic processing [J]. Science, 1992, 258(5079):126-129.
- [12] MANDAL P K, PETTEGREW J W, MASLIAH E, et al. Interaction between A β peptide and a synuclein: molecular mechanisms in overlapping pathology of Alzheimer's and Parkinson's in dementia with Lewy body disease [J]. Neurochem Res, 2006, 31(9):1153-1162.
- [13] TSIGELNY I F, BAR-ON P, SHARIKOV Y, et al. Dynamics of alpha-synuclein aggregation and inhibition of pore-like oligomer development by beta-synuclein [J]. Febs J, 2007, 274(7):1862-1877.
- [14] 刘小利, 王陆瑶, 胡文祥. μ 阿片受体的三维结构预测及活性位点分析[J]. 化学通报, 2009, 72(2):133-137.
- [15] JENSEN P H, NIELSEN M S, JAKES R, et al. Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation [J]. Biol Chem, 1998, 273(41):26292-26294.