

На правах рукописи

Истрате Андрей Николаевич

**СТРУКТУРНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ МЕТАЛЛСВЯЗЫВАЮЩЕГО
ДОМЕНА ПРИРОДНЫХ ВАРИАНТОВ БЕТА-АМИЛОИДА В
РАСТВОРЕ КАК ФАКТОР АГРЕГАЦИИ ПРИ РАЗВИТИИ
БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА**

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва, 2014 г.

Работа выполнена в Лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук

Научные руководители: Заведующий Лабораторией конформационного полиморфизма белков в норме и патологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук доктор биологических наук, профессор, академик РАН Макаров Александр Александрович

Официальные оппоненты: Ведущий научный сотрудник факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, доктор химических наук Польшаков Владимир Иванович
Заведующий лабораторией химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, доктор химических наук, профессор Немухин Александр Владимирович.

Заведующий лабораторией Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д.Зелинского Российской академии наук, кандидат химических наук Качала Вадим Вадимович.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Защита диссертации состоится 23 декабря 2014 г. в 11-00 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.235.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991 г. Москва, ул. Вавилова, 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991 г. Москва, ул. Вавилова, 32.

Автореферат разослан _____ 2014 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат химических наук

Крицын А. М.

Актуальность проблемы

Болезнь Альцгеймера – это тяжелое нейродегенеративное заболевание головного мозга, приводящее к потере памяти и прогрессирующей деградации личности. Болезнь медленно прогрессирует, и в течение 5-15 лет приводит к поражению психомоторных функций и остановке дыхания. В группу риска входят люди старше 55-ти лет, независимо от их национальности и социально-экономического статуса. Этим заболеванием страдает более 37 миллионов человек по всему миру. Болезнь Альцгеймера была впервые описана более ста лет назад, но широкое исследование причин, симптомов, факторов риска и методов ее лечения проводится только последние 30 лет. Хотя исследователи продвинулись далеко вперед в этом вопросе, причины возникновения данного заболевания, за исключением его некоторых наследственных форм, остаются неизвестными.

Существуют несколько конкурирующих концепций молекулярного механизма Болезни Альцгеймера (БА), наиболее популярной из которых является т.н. «амилоидная гипотеза». Согласно этой гипотезе, накопление бета-амилоидного пептида (A β) в олигомерных и полимерных формах провоцирует синаптическую дисфункцию и клеточную смерть. A β - это короткий пептид, состоящий из 39-43 аминокислот, который образуется из более крупного трансмембранного белка-предшественника, выполняющего трофическую и защитную функции. Бета-амилоид является нормальным компонентом биологических жидкостей и присутствует примерно в равных концентрациях, как у больных, так и у здоровых людей. До недавнего времени A β считался биологическим «мусором», однако в недавних работах было показано, что этот пептид выполняет важные физиологические функции.

Согласно «амилоидной гипотезе» A β , по неизвестным до конца причинам образует нейротоксические растворимые олигомеры, которые в дальнейшем агрегируют с образованием нерастворимых амилоидных бляшек в определенных участках головного мозга. По мнению многих специалистов, агрегаты A β губительно действуют на нервные клетки, нарушая их нормальное функционирование и вызывая симптомы БА. В недавних работах было показано, что ионы переходных металлов, такие как цинк, медь или железо, способствуют процессу агрегации пептида. Было также показано, что усеченная форма бета-амилоида, состоящая из аминокислотных остатков 17-42, не образует отложений *in vivo*, а, следовательно, участок 1-16, называемый металлсвязывающим фрагментом бета-амилоида, играет ключевую роль в процессе образования амилоидных бляшек.

Бета-амилоид обнаружен у всех млекопитающих. В этой связи интересен тот факт, что у грызунов, в частности у мышей и крыс, не наблюдается образования амилоидных бляшек. Важно отметить, что первичная структура амилоидного пептида этих млекопитающих и человека различаются всего тремя аминокислотными остатками, расположенных именно в металлсвязывающем домене (рис. 1).

1-16

17-42

DAE**F**RHDSGYEV**H**HQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV**V**I**A** Aβ человека

DAE**F**G**H**DSG**F**EV**R**HQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV**V**I**A** Aβ крысы

Рисунок 1. Аминокислотная последовательность бета-амилоида человека и крысы.

Хотя большинство случаев БА являются спорадическими, известно, что определенная их часть обусловлена мутациями в гене, кодирующим ПБА. Одной из таких мутаций является H677R, соответствующая замене H6R в Aβ, которая была обнаружена в 2000 году в английской семье. Было установлено, что «английская мутация» приводит к более быстрому фибриллообразованию. Кроме того, показано, что олигомеры Aβ^{H6R} проявляют более высокую токсичность к нейронам в сравнении с олигомерами пептида дикого типа.

Следует также отметить еще один важный факт, характеризующий развитие болезни Альцгеймера. Спонтанная изомеризация остатка аспаргиновой кислоты в седьмом положении Aβ неизбежно приводит к цинк-зависимой олигомеризации. Поскольку вероятность образования изоаспартата из аспарагина выше вероятности изомеризации аспарагиновой кислоты, то другая патологическая мутация D7N (Tottori), как предполагается, обусловлена повышением доли пептида, содержащего изоаспартат в положении 7.

Сравнение трехмерных структур металлсвязывающего фрагмента Aβ человека со структурой аналогичного фрагмента пептида крысы, а также со структурами патогенных изоформ Aβ человека (с заменой H6R и изоаспартатом в положении 7), может сыграть важную роль в установлении механизма агрегирования бета-амилоида. Это также важно для разработки рациональных методов поиска лекарственных средств, эффективных для предотвращения развития и лечения болезни Альцгеймера.

Структура металлсвязывающего фрагмента нативной формы бета-амилоида человека в растворе была определена ранее. Настоящая работа посвящена установлению структуры металлсвязывающего фрагмента бета-амилоида крысы и аналогичных фрагментов бета-амилоида человека, содержащих изоаспартат в положении 7 и изоформу пептида H6R, в свободном состоянии и в комплексе с ионами цинка.

Цель работы

Целью данной работы является определение пространственной структуры металлсвязывающего домена бета-амилоида крысы (RatAβ(1-16)), металлсвязывающего домена бета-амилоида человека содержащего замену гистидина на аргинин в шестом положении (Aβ^{H6R}(1-16)) и металлсвязывающего домена бета-амилоида человека содержащего изомеризованный остаток аспаргиновой кислоты в положении 7 (Aβ^{D7iso}(1-16)) в свободной форме и в комплексе с ионом цинка, а также установление влияния строения указанных пептидов на олигомеризацию бета-амилоида при болезни Альцгеймера.

Задачи исследования

1. Разработка протокола расчета структуры коротких пептидов в явно выраженном водном окружении с использованием пакета программ GROMACS и ограничений, полученных методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР).
2. Определение трехмерной структуры металлсвязывающего домена бета-амилоида крысы в свободной форме и в комплексе с ионом цинка методом ЯМР.
3. Определение трехмерной структуры металлсвязывающего домена бета-амилоида человека содержащего изомеризованный остаток аспаргиновой кислоты в положении 7 в свободной форме и в комплексе с ионом цинка методом ЯМР.
4. Определение трехмерной структуры металлсвязывающего домена бета-амилоида человека содержащего замену гистидина на аргинин в шестом положении в свободной форме и в комплексе с ионом цинка методом ЯМР.
5. Моделирование строения олигомеров бета-амилоида на основе определенных структур.

Научная новизна работы

В работе впервые разработан протокол расчета структур коротких пептидов на основе данных полученных методом ЯМР с помощью пакета программ молекулярной динамики GROMACS, с использованием растворителя в явном виде. Путем изменения кода программы GROMACS, добавлена опция, которая позволяет изменять вес ограничений на расстояния в процессе расчета.

Впервые определена структура металлсвязывающего домена бета-амилоида крысы в свободной форме и в комплексе с ионом цинка. Было выявлено, что в свободном состоянии пептид состоит из двух структурированных концевых субдоменов, соединенных подвижным линкером. Комплекс металлсвязывающего домена бета-амилоида крысы с ионом цинка представляет собой димер, состоящий из двух цепей пептида одинаковой структуры связанных с одним ионом цинка. Цепи пептида в димере имеют параллельную ориентацию с С-концами направленными в противоположные стороны. На основе определенной структуры димера впервые высказана гипотеза о том, что ориентация С-концов пептида в димере препятствует дальнейшей агрегации гидрофобных фрагментов Аβ, что может являться причиной устойчивости крыс к болезни Альцгеймера. Полученное семейство структур димера депонировано в банк данных белковых структур PDB (код 2L19).

Впервые определена структура металлсвязывающего домена изоформы бета-амилоида человека, соответствующего продукту английской мутации Аβ^{H6R}(1-16) в комплексе с ионом цинка. Комплекс представляет собой димер, состоящий из двух цепей пептида идентичной структуры, связанных с одним ионом цинка, при этом топология димера Аβ^{H6R}(1-16) существенным образом отличается от топологии димера RatАβ(1-16). На основе полученной структуры

димера $A\beta^{H6R}(1-16)$ и ранее определенной структуры олигомера, состоящего из фрагментов $A\beta(17-42)$, построена модель олигомера полноразмерного $A\beta^{H6R}$ в комплексе с Zn^{2+} . Результаты моделирования показали, что образование димера способствует дальнейшей олигомеризации бета-амилоида человека, содержащего замену гистидина на аргинин в шестом положении. Семейство структур комплекса $A\beta^{H6R}(1-16)$ с ионом цинка депонировано в банк данных белковых структур PDB (код 2MGT).

Апробация работы

Результаты работы были представлены на конференциях: XII молодежной научной школе-конференции «Актуальные проблемы магнитного резонанса и его применения» (Казань, 5-8 октября 2009 года); XVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2010» (Москва, 12-15 апреля 2010 года); XXV International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (Лион, 19-24 августа 2012 года); Научной школе конференции «ЯМР спектроскопия в физике: теория и практика» (23 ноября, 2012, Долгопрудный, Россия); FEBS Congress “Mechanisms in Biology” (Санкт-Петербург, 6-11 июля, 2013); “Magnetic resonance: fundamental research and pioneering applications” (Казань, 23-27 июня, 2014); EUROMAR 2014 (Цюрих, 29 июня – 3 июля 2014 года).

Публикации

По теме диссертации было опубликовано 11(10) печатных работ, 4(3) из которых – статьи в рецензируемых научных журналах.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Экспериментальная часть», «Результаты и их обсуждение», «Выводы», «Список литературы» и «Приложение». Работа изложена на 124 страницах машинописного текста, содержит 16 таблиц(ы) и 59 рисунков. Библиография включает 208 источников.

Результаты и их обсуждение

Отнесение сигналов

Отнесение сигналов всех исследованных пептидов в спектрах ЯМР проводили по классической методике, основанной на измерении и анализе двумерных (2D) спектров DQF-COSY, TOCSY, NOESY, ROESY, ^{13}C - 1H HSQC ^{15}N - 1H HSQC. Спектры гетероядерной корреляции измеряли на естественном содержании изотопов ^{13}C и ^{15}N . Результатом отнесения стала практически полная идентификация значений химических сдвигов ядер 1H , ^{13}C и ^{15}N исследуемых пептидов. Некоторые статистические результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Статистика отнесения сигналов ЯМР исследованных пептидов.

Пептид	$^1\text{H}^a$, %	$^1\text{H}^{\text{amide}}$, %	^1H , %	^{15}N , %	$^{13}\text{C}^a$, %
$\text{A}\beta^{\text{D}7\text{iso}}(1-16)$	100	100	91	100	81
$\text{A}\beta^{\text{D}7\text{iso}}(1-16)+\text{Zn}^{2+}$	100	100	87	-	90
$\text{RatA}\beta(1-16)$	100	100	89	81	88
$\text{RatA}\beta(1-16)+\text{Zn}^{2+}$	100	100	83	-	94
$\text{A}\beta^{\text{H}6\text{R}}(1-16)$	100	100	86	100	100
$\text{A}\beta^{\text{H}6\text{R}}(1-16)+\text{Zn}^{2+}$	100	100	84	69	100

Отнесения сигналов в спектрах NOESY в дальнейшем использовали для получения набора ограничений на межъядерные расстояния.

Оптимизация протокола расчета структуры пептидов программой GROMACS

Для оптимизации метода расчета структуры коротких пептидов в водном окружении были рассчитаны семейства структур модельного пептида по 18-ти различным протоколам. Пригодность того или иного протокола оценивали по следующим критериям: качество структуры полипептидной цепи, стабильность системы, сольватация молекулы пептида, время расчета, адекватность параметров системы (объем, энергия, давление, плотность).

Наилучший результат был получен при использовании протокола, состоящего из двух этапов:

1) На первом этапе пептид нагревали до температуры 1500К, а растворитель до 600К. Далее система термостатировалась в течении 1 пс, затем температуру пептида понижали с шагом 100К и скоростью 100 К/пс до достижения температуры растворителя (600К). После каждого шага охлаждения систему термостатировали в течении 1 пс. Далее скорость охлаждения уменьшали до 50 К/пс, а время термостатирования увеличивали до 3 пс, и также охлаждали с шагом 100К до 300К. При температуре 300К систему термостатировали в течение 10 пс, затем снова охлаждали с шагом 100К (скорость охлаждения 50 К/пс). После каждого шага охлаждения систему термостатировали в течение 3 пс. Вес ограничений менялся ступенчато на последнем шаге термостатирования от 0 до 1000. Длина траектории на первом этапе составила 58 пс. Время расчета с использованием 320 процессоров суперкомпьютера СКИФ-МГУ составляло 8 минут для семейства из 20-ти структур.

2) На втором этапе систему нагревали до температуры 600К, далее термостатировали в течение 8 пс, после чего охлаждали с шагом 100К (скорость охлаждения 25К/пс) до 0К. После каждого шага охлаждения систему термостатировали в течение 8 пс. На втором этапе использовали постоянный вес ограничений. Длина траектории на втором этапе составила 84 пс. Время расчета с использованием 320 процессоров составило 8 минут для семейства из 20-ти структур.

Во всех расчетах использовали силовое поле AMBER-03. Для поддержания постоянных величин температуры и давления использовали Берендсеновский баростат и Берендсеновский термостат с масштабированием скоростей (Velocity

rescale). Для контроля длин ковалентных связей применяли алгоритм LINCS (Linear Constraint). Энергию электростатических взаимодействий рассчитывали по алгоритму сетки частиц Эвальда (Particle Mesh Ewald). Именно для этого алгоритма поддерживается эффективное распараллеливание расчетов в программе GROMACS. Максимальные расстояния действия потенциалов Кулоновских взаимодействий и сил Ван-дер-Ваальса составляли 1.0 и 1.4 нм соответственно. Шаг интегрирования составлял 2 фс.

На рисунке 2 представлены для сравнения семейства структур модельного пептида из базы данных белковых структур (pdb, код ID9L), рассчитанные авторами указанной структуры с использованием программы X-PLOR, и семейство, рассчитанное по описанному выше оптимизированному протоколу в программе GROMACS при использовании тех же самых экспериментальных ограничений. Можно видеть, что структуры хорошо суперпозируются, а концы пептидов семейства рассчитанного в программе GROMACS структурированы существенно лучше.

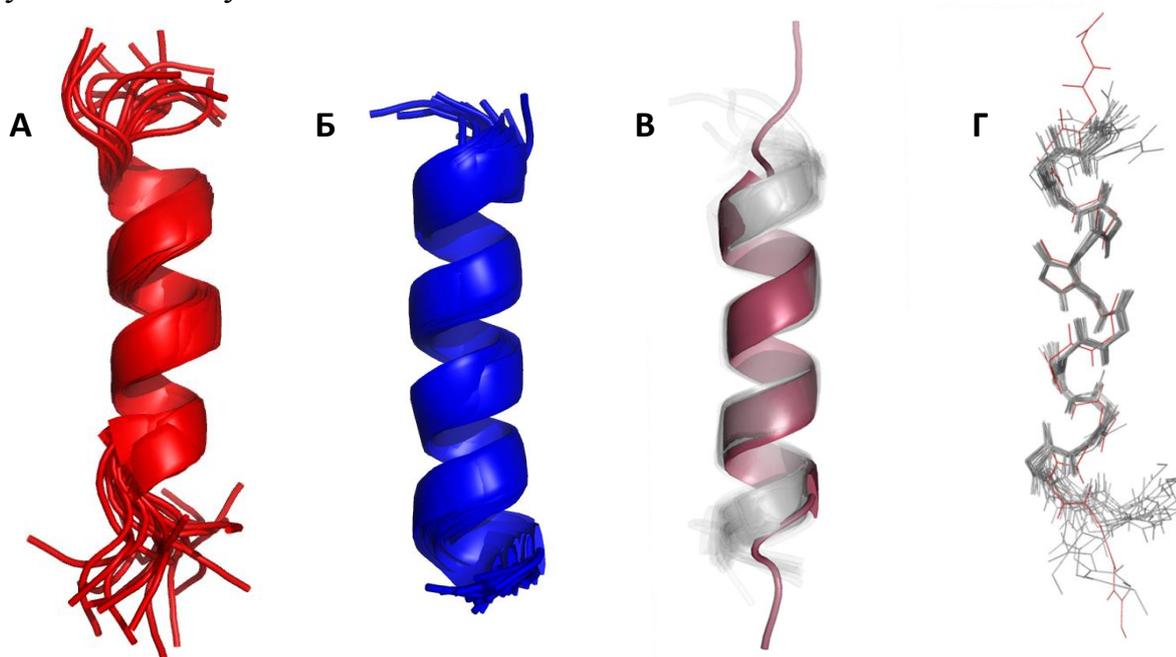


Рисунок 2. А. Семейство структур ID9L, которые рассчитаны авторами структуры с использованием программы X-PLOR. Б. Семейство структур, рассчитанное с использованием программы GROMACS и оптимизированного протокола расчета. В, Г- суперпозирование семейства структур, рассчитанного в программе GROMACS на репрезентативную структуру семейства ID9L (фиолетовым). Показана α -спираль и основная цепь.

Статистическая характеристика семейств структур ЯМР, включая величины средних квадратичных отклонений (СКО) координат атомов, представлена в таблице 2. Особо следует отметить, тот факт, что процент аминокислотных остатков, находящихся в наиболее благоприятной области карты Рамачандрана, в случае расчета по оптимизированному протоколу в программе GROMACS соответствует лучшим рентгеновским структурам высокого разрешения. В случае

расчета с использованием стандартных подходов эта величина оказывается гораздо ниже.

Определение структуры небольших пептидов сопряжено с трудностями, обусловленными их высокой подвижностью и конформационной пластичностью. Даже в том случае, когда существует доминантная конформация полипептидной цепи, получение из спектров ЯМР большого числа ограничений на межъядерные расстояния и диэдральные углы, как правило, невозможно, поскольку за время смешения в спектрах NOESY (от 100 до 400 мс) молекула успевает принять несколько конформационных состояний. Поэтому важно использовать наиболее реалистичные методы расчета и силовые поля, описывающие возникающие в процессе укладки пептидной цепи межатомные взаимодействия.

Таблица 2. Статистические характеристики семейств структур.

	Депонированное семейство ID9L	Семейство, рассчитанное по оптимизированному протоколу
Нарушение ограничений на расстояния	0.066±0.002	0.096±0.004
% остатков в наиболее благоприятной области карты Рамачандрана	80.3	97.6
% остатков в запрещенной области карты Рамачандрана	0	0
Суперпозиция структур семейства на репрезентативную структуру		
СКО по атомам C, Ca, O и N	2.52±0.56	0.99±0.06

Полученные результаты свидетельствуют о том, что использование более реалистичного силового поля, включающего, в частности, потенциал электростатических взаимодействий, и расчет молекулярной динамики в водном окружении позволяют существенно снизить СКО координат подвижных фрагментов пептида, для которых не удастся экспериментально определить достаточное количество ограничений ЯМР. Вместе с тем, введение зарядового потенциала и водного окружения вносит и дополнительные сложности в поиск оптимальной структуры для данного набора ограничений. Это, по-видимому, обусловлено сольватацией исходной вытянутой цепи белка и дополнительной стабилизацией промежуточных состояний. В этой связи, для эффективного поиска минимума энергии необходимо применять высокую начальную температуру динамики и проводить медленное охлаждение системы. Поэтому длительность траектории МД при расчете в водном окружении увеличили более чем в 4 раза, по сравнению с алгоритмом расчета в вакууме.

Разработанный протокол может быть использован при расчете структуры коротких пептидов при ограниченном количестве экспериментальных ограничений. Важнейшим достоинством разработанного алгоритма является высокое качество получаемых структур, определяемое по параметрам карты Рамачандрана. Этот подход также может быть полезен для оптимизации

структуры более крупных белков, содержащих неструктурированные фрагменты, чтобы получить наиболее достоверные данные о динамическом ансамбле конформаций, присутствующих в растворе.

Расчет структур пептида RatAβ(1-16) в свободном состоянии и в комплексе с цинком

ЯМР спектры свободного пептида RatAβ(1-16) содержат узкие сигналы, характерные для коротких мономерных пептидов, которые уширяются при добавлении ионов Zn^{2+} (рис. 41). Наблюдаемые изменения в спектрах указывает на образование комплекса RatAβ(1-16) с ионами цинка. Природа цинк-зависимого уширения сигналов для различных форм Aβ была изучена ранее. Показано, что причиной этого феномена является обмен между различными конформациями пептида при связывании с ним ионов цинка.

Изменение химических сдвигов RatAβ(1-16) при связывании ионов цинка с пептидом (рис. 3) свидетельствует об участии аминокислотных остатков His6 и His14 в координации иона цинка. Эти выводы также подтверждаются значительным уширением сигналов Hε1 этих аминокислотных остатков (рис. 4). Однако, вследствие высокой конформационной пластичности пептида RatAβ(1-16) в растворе, цинк-индуцированные изменения химических сдвигов сравнительно невелики, и поэтому не могут быть использованы для однозначного определения аминокислотных остатков, участвующих в координации цинка.

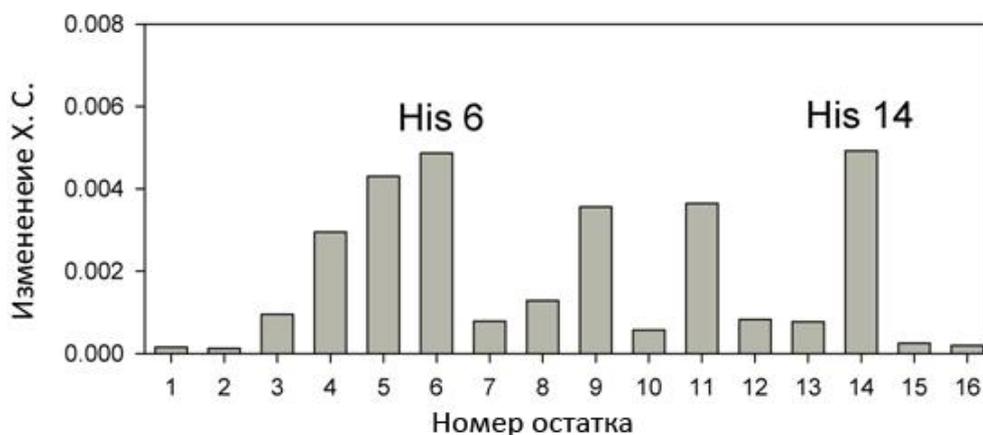


Рисунок 3. Среднеквадратичное отклонение величин химических сдвигов 1H и ^{13}C комплекса RatAβ(1-16) с ионами цинка относительно свободной формы RatAβ(1-16).

Более точное определение аминокислотных остатков, координирующих ионы цинка в комплексе $RatA\beta(1-16)\cdot Zn^{2+}$ было проведено коллегой (А.А. Куликовой, ИМБ РАН) с помощью метода изотермической калориметрии титрования. Этот метод также позволил определить стехиометрию взаимодействия Rat Aβ(1-16) с ионами цинка. С этой целью были исследованы фрагменты Aβ(1-16) крысы и его аналоги, в которых аминокислотные остатки, способные взаимодействовать с ионами цинка, были последовательно заменены на аланин. Было определено, что стехиометрия взаимодействия с Zn^{2+} пептида

RatA β (1-16) и большинства его аналогов с аланиновыми заменами равна 2:1, т.е. один ион цинка связывается с двумя молекулами пептида. Это свидетельствует об образовании димера, содержащего один ион цинка. При этом замена Asp1, Glu3, и Asp7 на остаток аланина не приводит к существенному изменению прочности связывания цинка с пептидом, что указывает на то, что эти остатки не принимают участия в координации. В то же время, замена His6 и His14 на остаток аланина приводит к полной потере способности пептида связывать ионы цинка. Это однозначно подтверждает выводы, полученные из анализа спектров ЯМР, что два остатка гистидина His6 и His14 ответственны за связывание иона металла. Кроме того, результаты ИКТ исследований свидетельствуют об образовании димера при взаимодействии Rat A β (1-16) с Zn²⁺.

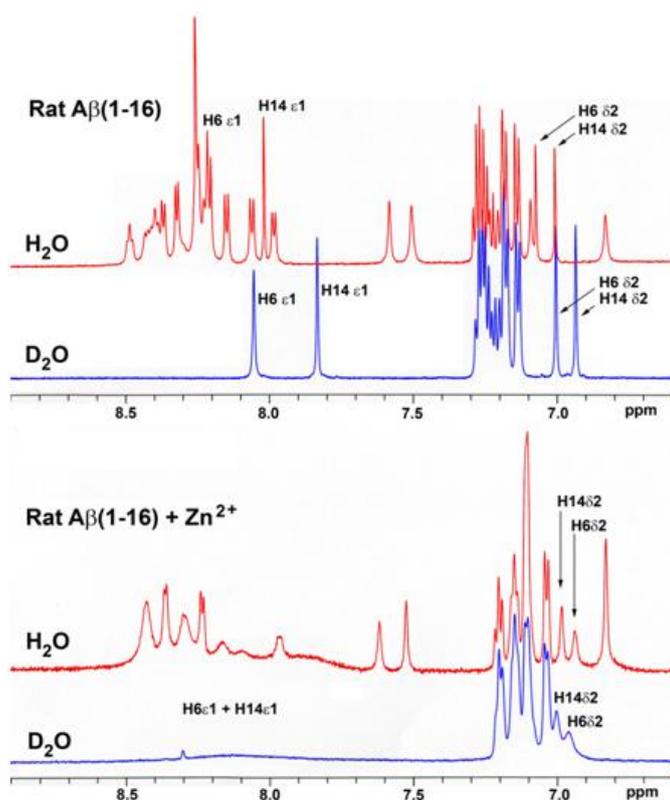


Рисунок 4. Фрагменты спектров ¹H ЯМР RatA β (1-16) в свободной форме и при добавлении двукратного молярного избытка ионов цинка.

С помощью ЯМР были определены атомы азота остатков гистидина, участвующие в хелатировании ионов цинка: N δ 1 в случае His-6 и N ϵ 2 в случае His-14. Для этого были проанализированы возможные ориентации имидазольного кольца гистидина для каждого типа хелатного центра. При этом сравнивали межатомные расстояния, определяемые для разных типов хелатирования с интенсивностями ЯЭО, наблюдаемыми в спектрах. Так, более интенсивные ЯЭО N δ 2-HN и N δ 2-N α для His14 и примерно одинаковая интенсивность ЯЭО N δ 2-N β обоих остатков His6 и His14 однозначно подтверждает выбор центров хелатирования иона металла.

Набор ограничений на расстояния и диэдральные углы (табл. 3), полученные в результате анализа спектров ЯМР, и описанный выше протокол расчета, были использованы для определения структур RatA β (1-16) в свободном состоянии и в комплексе с ионом цинка. Семейство структур ЯМР показывает, что свободный RatA β (1-16) сравнительно слабо структурирован: СКО координат тяжелых атомов основной цепи (C', C α , N и O) составляет 2.31 \pm 0.55 Å. Однако при суперпозиции C и N-концевых участков пептида СКО становится меньше (1.98 \pm 0.36 Å для N-терминального участка (1-6) и 1.66 \pm 0.36 Å для C-терминального участка (7-16)), что указывает на существование двух небольших сравнительно устойчивых доменов соединенных более подвижным линкером (рис. 5).

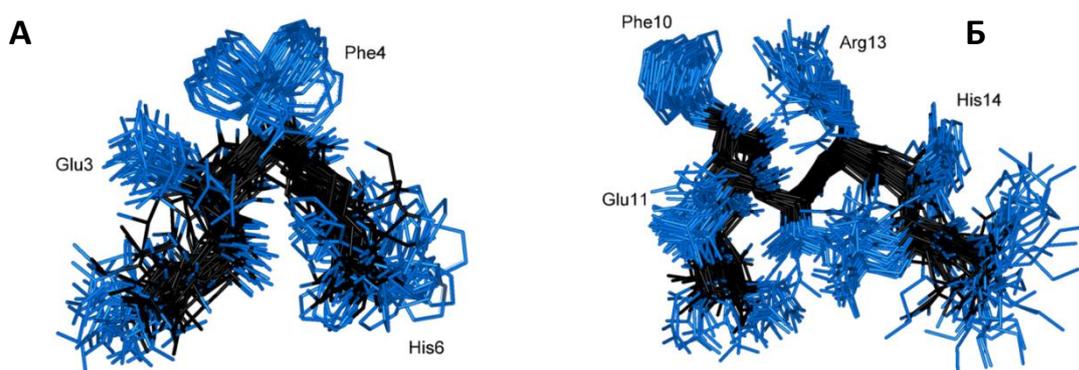


Рисунок 5. Семейство из 40 структур свободного RatA β (1-16), суперпозированное по N-терминальному участку 1-6 (А) и по C-терминальному участку 7-16 (Б).

Таблица 3. Количество ограничений ЯМР, использованных для расчета структур и статистика полученных семейств конформеров.

	Rat A β (1-16)	Димер Rat A β (1-16)/Zn ²⁺
Количество ЯЭО ограничений	111	120
Intra-residue	55	72
Sequential	45	33
Medium-range	11	15
Long-range ($ i-j >4$)	0	0
Количество ограничений на диэдральные углы	0	3
Количество ограничений хелатного центра	0	8
Статистика карты Рамачандрана		
Остатков в наиболее благоприятной области (%)	79.8	68.1
Остатков в запрещенной области (%)	0.0	0.0
Количество структур в семействе	40	20
Количество нарушений ЯЭО (>0.5Å) на структуру	2	0
СКО координат атомов C', C α and N при суперпозиции структур в семействе (Å)	2.31 \pm 0.55	1.46 \pm 0.48

При расчете структуры RatA β (1-16) в комплексе с ионом цинка были использованы ограничения, полученные в результате анализа спектров ЯМР, а также набор ограничений на геометрию центра хелатирования иона цинка, полученные с помощью квантово-механических расчетов. Химические сдвиги, принадлежащие аминокислотным остаткам разных цепей димера не различаются,

что свидетельствует об образовании симметричного димера. Теоретически возможны две ориентации цепей пептида в димере – параллельная и антипараллельная. Расчеты показали, что только параллельная ориентация соответствует экспериментально полученным ограничениям ЯМР (рис. 6, А). При расчете структуры с антипараллельной ориентацией цепей обнаруживается большее количество нарушений на дистанционные ограничения ЯМР. На рис. 6 А представлено семейство из 20 структур димера $\text{RatA}\beta(1-16)\cdot\text{Zn}^{2+}$. СКО координат тяжелых атомов основной цепи (C', Ca, N и O) димера составляет $1.46\pm 0.48 \text{ \AA}$, а при суперпозиции каждой цепи по отдельности СКО составляет $1.13\pm 0.59 \text{ \AA}$ (цепь А) и $1.06\pm 0.27 \text{ \AA}$ (цепь В). Рассчитанное семейство было депонировано в базу данных белковых структур (PDB), идентификационный код 2LI9. Результаты отнесения сигналов в спектрах ЯМР депонированы в Biological Magnetic Resonance Bank, идентификационный номер 17884. Репрезентативная структура семейства была дополнительно минимизирована с помощью совместных расчетов по методам квантовой механики и молекулярной динамикой (КМ/ММ) для уточнения координат окружения иона цинка (рис. 6 Б).

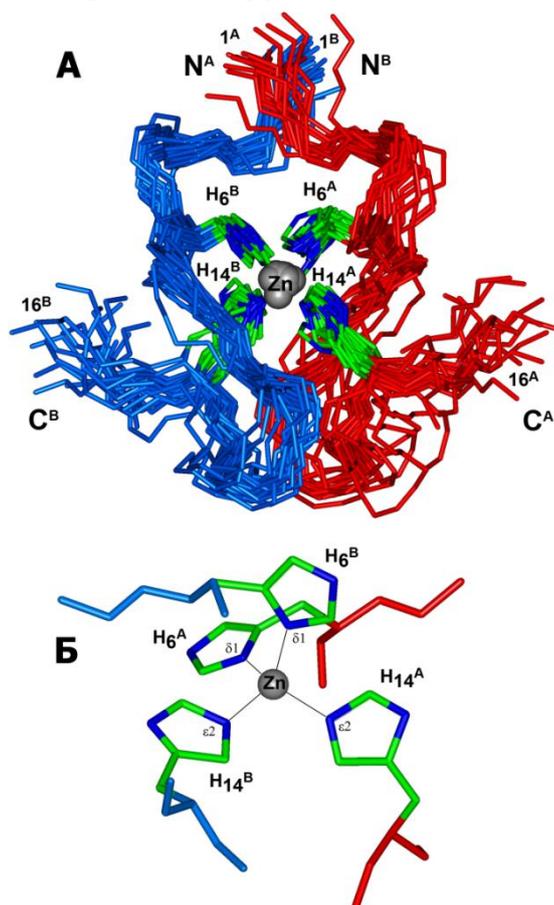


Рисунок 6. Структура димера $\text{RatA}\beta(1-16)\cdot\text{Zn}^{2+}$ в растворе (20 конформеров ЯМР, депонированных в базу данных PDB, код 2LI9). Показаны только атомы основной цепи (Ca, C and N) и боковых цепей остатков гистидина. Цепи А и В димера окрашены в красный и синий цвет соответственно. Отмечены N и C концы цепей. А. Семейство из 20-ти ЯМР структур. Б. Координация иона цинка в репрезентативной структуре после дополнительной КМ/ММ оптимизации геометрии. Среднее расстояние между атомами азота остатков гистидина ($\text{N}\delta 1$ и $\text{N}\epsilon 2$) и ионом цинка $2.07 \pm 0.05 \text{ \AA}$.

Как уже отмечалось выше, пептидные цепи димера $\text{RatA}\beta(1-16)\cdot\text{Zn}^{2+}$ уложены параллельно, при этом N-терминальные участки расположены близко друг к другу, а C-терминальные участки направлены в противоположные стороны относительно друг друга. Следует отметить, что в координации иона цинка участвует только остаток гистидина, хотя пептид содержит несколько других аминокислотных остатков, способных хелатировать ион цинка, таких, как Asp и Glu. Это отличает пептид $\text{A}\beta(1-16)$ крысы от его человеческого аналога, где координационную сферу иона цинка образуют остатки His6, Glu11, His13 и His14.

Согласно литературным данным, образованию нерастворимых фибрилл предшествует взаимодействие металлсвязывающих доменов $\text{A}\beta$. Это взаимодействие индуцирует благоприятное взаимное расположение гидрофобных участков (17-42), после чего становится возможным их агрегирование. Можно предположить, что противоположная ориентация C-концов в димере $\text{RatA}\beta(1-16)$

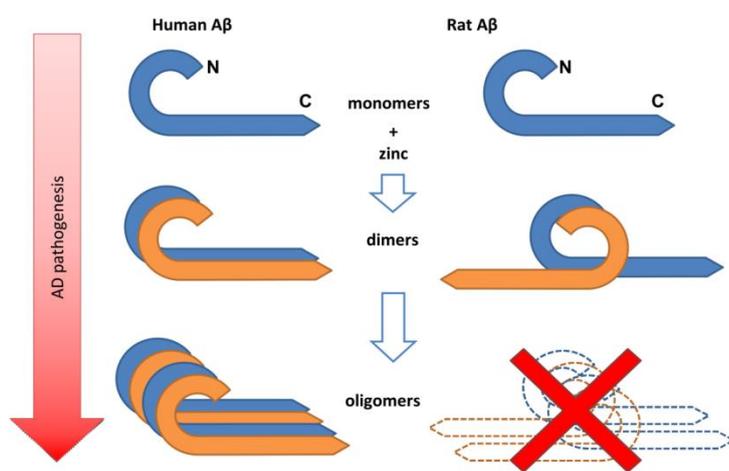


Рисунок 7. Структурное различие $\text{A}\beta$ человека и крысы может быть причиной устойчивости крыс к болезни Альцгеймера. На рисунке представлен полноразмерный $\text{A}\beta$ с металлсвязывающим доменом в виде изгиба.

препятствует дальнейшей сборке олигомеров (рис. 7), поскольку участки 17-42 соседних цепей не могут быть сближены. С другой стороны, конформация $\text{A}\beta(1-16)$ человека благоприятна для олигомеризации с образованием упорядоченных фибриллярных агрегатов. Ранее было показано, что фрагмент EVNH пептида $\text{A}\beta$ человека (остатки 11-14) является основным цинк-связывающим участком. Этот участок содержит три аминокислотных остатка способных хелатировать ион цинка в отличие от аналогичного участка $\text{A}\beta$ крысы (EVRH), который содержит только два

таких остатка. Было высказано предположение, что эта дополнительная хелатирующая группа (His13) в $\text{A}\beta$ человека может быть ответственна за взаимодействие мономеров друг с другом. В результате отсутствия этого аминокислотного остатка в $\text{A}\beta$ крысы энергетически выгодная координация иона цинка достигается только при образовании димера, что препятствует дальнейшей олигомеризации полноразмерного $\text{A}\beta$ крысы. Это также может вносить вклад в устойчивость крыс к болезни Альцгеймера.

Расчет структур пептида $\text{A}\beta^{\text{H6R}}(1-16)$ в комплексе с цинком

Металлсвязывающий фрагмент английской мутантной формы $\text{A}\beta$ человека, содержащей аргинин вместо гистидина в шестом положении $\text{A}\beta^{\text{H6R}}(1-16)$, в растворе существует в мономерной форме. Об этом свидетельствуют узкие сигналы в спектрах ЯМР свободного пептида (рис. 8А). Как и в случае

металлсвязывающего фрагмента A β крысы, добавление ионов Zn²⁺ приводит к существенному конформационному уширению сигналов (рис. 8Б). Следует отметить, что в отличие от A β (1-16) крысы, кроме уширения сигналов, вызванного добавлением ионов цинка, в спектрах ЯМР пептида A β ^{H6R}(1-16) после его взаимодействия с Zn²⁺ появляется двойной набор сигналов. Так, например, кроме сигналов при 0.75 и 0.85 м.д., соответствующих метильным группам остатка Val12, появляется новый сигнал при 0.2 м.д., принадлежащий одной из метильных групп того же остатка Val12. Это указывает на существование двух сравнительно стабильных структурных форм пептида в растворе при добавлении ионов цинка. Существование двух резонансных положений одной и той же группы свидетельствует о медленном (в шкале времени ЯМР) обмене между этими двумя формами. Дальнейшие исследования показали, что при добавлении ионов цинка наблюдается два процесса – образование мономерного комплекса пептида с ионом цинка и дальнейшее его превращение в стабильный димер, состоящий из двух молекул пептида и одной молекулы иона цинка. При этом две наблюдаемые в спектрах ЯМР формы пептида соответствуют мономеру и димеру.

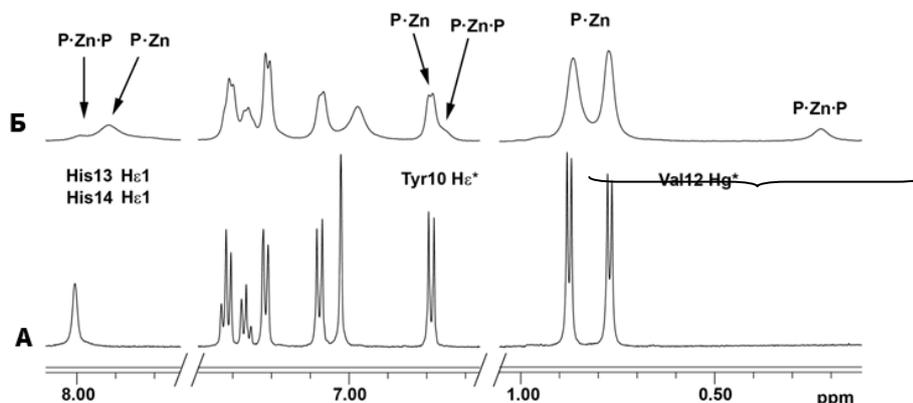


Рисунок 8. Репрезентативные фрагменты ¹H ЯМР спектров свободного A β ^{H6R}(1-16) (А) и при добавлении двукратного избытка ZnCl₂ (Б). Концентрация пептида составила 1.1 мМ. Спектры измерены в 10 мМ буфере бис-трис-d₁₉ в D₂O, при pH 6.8, T=283 К.

Изменение химических сдвигов сигналов A β ^{H6R}(1-16) при добавлении ионов цинка свидетельствует о существовании равновесия между свободным пептидом и комплексом. В случае быстрого обмена (в шкале времени ЯМР), соответствующего процессу образования мономерного комплекса, химические сдвиги принимают значения, усредненные между значениями химических сдвигов свободного и связанного пептида. Обмен между мономерным P·Zn и димерным P·Zn·P комплексами оказывается более медленным процессом, и в этом случае в спектрах ЯМР наблюдаются отдельный набор сигналов для каждого из этих комплексов.

Существование равновесия между мономерным и димерным комплексами прямо подтверждается с помощью двумерных спектров ROESY. На этих спектрах кросс пики, возникающие в результате ЯЭО (диполь-дипольное взаимодействие ядер через пространство) имеют отрицательные значения интенсивности, а кросс-

пики, возникающие в результате химического обмена, имеют положительную интенсивность. Так, например, обменные кросс пики с положительными значениями наблюдаются между сигналами $\text{H}\gamma 1^*$ Val-12, сигналами $\text{H}\beta$ Val-12, и многими другими сигналами.

Следует заметить, что удвоение сигналов ЯМР наблюдается только для аминокислотных остатков, расположенных в С-концевом фрагменте 9-16, в то время как сигналы N-терминального участка пептида в мономерном и димерном комплексе имеют практически идентичные значения химических сдвигов.

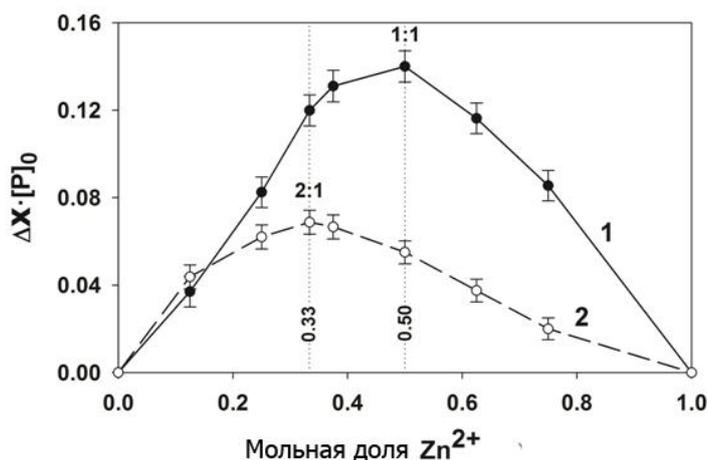


Рисунок 9. Анализ изменения химических сдвигов $\text{H}\epsilon 1$ остатков гистидина (кривая 1) и относительной интенсивности сигналов Val12 $\text{H}\gamma 1^*$ при 0.2 м.д. (кривая 2) в эксперименте по методу изомолярного титрования Джобса.

(рис. 9, кривая 1), что соответствует стехиометрии взаимодействия 1:1. Для мониторинга образования димера была использована интегральная интенсивность его сигналов, например, хорошо разрешенного сигнала $\text{H}\gamma 1^*$ остатка Val12 при 0.2 м.д. Изменение относительной интенсивности этого сигнала, построенное в координатах Джобса, в зависимости от добавленной доли Zn^{2+} , имеет максимум при значении ~ 0.33 , что соответствует стехиометрии взаимодействия пептид : цинк = 2:1. Таким образом, данные ЯМР однозначно свидетельствуют о том, что при связывании ионов цинка с пептидом $\text{A}\beta^{\text{H6R}}(1-16)$ образуются два комплекса со стехиометрией взаимодействия 1:1 и 2:1 соответственно.

Термодинамические исследования взаимодействия пептида $\text{A}\beta^{\text{H6R}}(1-16)$ с ионами цинка, проведенные нашими коллегами с помощью методов ИКТ (работа А.А. Куликовой, ИМБ РАН) и поверхностного плазмонного резонанса, полностью подтвердили выводы об образовании мономерного и димерного комплексов пептида с ионами цинка, полученными методом ЯМР. Так, было установлено, что стехиометрия связывания цинка, измеренная с помощью ИКТ, зависит от начальной концентрации пептида, и равна ~ 0.8 при концентрации $\text{A}\beta^{\text{H6R}}(1-16)$ 0.4 мМ и приближается к 0.5 при увеличении концентрации до 0.75 мМ. Кроме того, калориметрические исследования показали, что двукратное увеличение

Стехиометрия взаимодействия пептида $\text{A}\beta^{\text{H6R}}(1-16)$ с ионами цинка, включая образования мономерной и димерной форм, была однозначно определена методом изомолярного титрования (метод Джобса). Так, при переходе от свободного пептида к его комплексу с ионами цинка наблюдается изменение химических сдвигов ряда сигналов. Одно из наиболее заметных изменений наблюдается для сигналов $\text{H}\epsilon 1$ остатков гистидина His13 и His14. Кривая зависимости изменения значений химических сдвигов этих сигналов, построенная в координатах Джобса, от доли Zn^{2+} имеет максимум при 0.5

концентрации пептида приводит к двукратному уменьшению абсолютного значения отрицательной энтропии связывания (от -0.6 до -0.33 кал·М⁻¹·К⁻¹). Такое изменение энтропии может быть объяснено вкладом гидрофобного взаимодействия в результате димеризации. Образование гидрофобного кластера было однозначно подтверждено данными, полученными из спектров ЯМР. Значения химических сдвигов аминокислотных остатков Val-12 и Tyr-10 претерпевают значительные изменения после образования димера. Например, химический сдвиг сигнала метильной группы Нγ1* Val12 меняется от ~ 0.9 м.д. до ~ 0.2 м.д. Химические сдвиги сигналов метильных групп принимают такие значения только в случае плотно упакованных глобулярных белков при близком расположении метильных групп относительно ароматических остатков или карбонильных фрагментов. Кроме того, спектры NOESY содержат большое количество ЯЭО между протонами аминокислотных остатков Val12 и Tyr10, что характерно для гидрофобного кластера. Это указывает на то, что образование димера частично стабилизировано гидрофобными взаимодействиями.

Для определения аминокислотных остатков участвующих в координации иона цинка, как в мономерной, так и в димерной формах, было проанализировано изменение значений химических сдвигов сигналов после добавления хлорида цинка. На рисунке 10 видно, что добавление ионов цинка оказывает наибольшее влияние на значения химических сдвигов сигналов ядер аминокислотных остатков Glu11, His13 и His14. Очевидно, что именно эти аминокислотные остатки, находящиеся в минимальном цинк связывающем фрагменте (¹¹EVNH¹⁴), участвуют в хелатировании иона цинка в мономерном комплексе. Потенциальными хелаторами иона цинка в димерном комплексе являются те же аминокислотные остатки. Очевидно, что интерфейс димеризации образован фрагментом ¹¹EVNH¹⁴. Кроме того, наблюдается существенное изменение химических сдвигов аминокислотных остатков, не способных хелатировать ионы цинка, например, Val12 и Tyr10. Эти изменения являются следствием конформационных перестроек, свидетельствующие об образовании гидрофобного кластера.

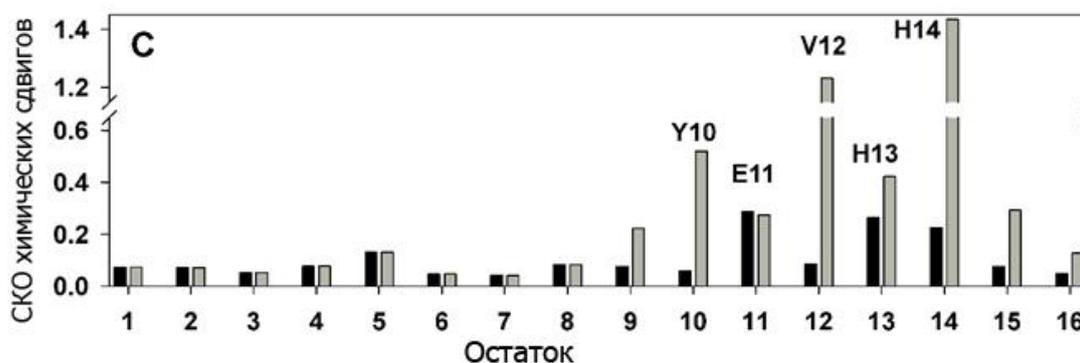


Рисунок 10. Среднеквадратичное отклонение величин химических сдвигов ¹Н и ¹³С комплекса Aβ^{H6R} (1-16) с ионами цинка в мономерном состоянии (показаны столбиками черного цвета) и в димерном состоянии (показаны столбиками серого цвета), относительно свободного пептида.

В недавней работе было исследовано взаимодействие фрагмента $^{11}\text{EVNH}^{14}$ с ионом цинка. Было показано, что в результате взаимодействия образуется симметричный димер состоящий из двух молекул пептида $^{11}\text{EVNH}^{14}$ и одной молекулы Zn^{2+} , а хелатирующими группами являются аминокислотные остатки Glu11 и His14. Эти данные хорошо согласуются с эффектами, наблюдаемыми при связывании цинка с $\text{A}\beta^{\text{H6R}}(1-16)$: изменения химических сдвигов His14 при связывании цинка существенно превышают аналогичные изменения His13. Исходя из этих данных при расчете структуры димерного комплекса $\text{A}\beta^{\text{H6R}}(1-16)$ с Zn^{2+} в качестве центров хелатирования были рассмотрены аминокислотные остатки Glu11 и His14.

Для определения конкретного атома азота His14, координирующего ион цинка (N δ 1 или N ϵ 2), были проанализированы возможные ориентации имидазольного кольца гистидина для каждого типа хелатного центра. При этом для каждой ориентации сравнивали межатомные расстояния с интенсивностями ЯЭО, наблюдаемыми в спектрах NOESY. Было установлено, что в случае координации иона цинка атомом азота N ϵ 2, расстояние между H α и H δ 2 превышает расстояние между HN и H δ 2 (рис. 11А). При координации иона цинка атомом N δ 1, расстояние между H α и H δ 2 оказывается меньше, чем расстояние между HN и H δ 2 (рис. 11Б). В спектрах NOESY интенсивность кросс пика между сигналами HN и H δ 2 оказывается выше интенсивности кросс пика между сигналами H α и H δ 2, из чего следует, что ион цинка координируется атомом азота N ϵ 2.

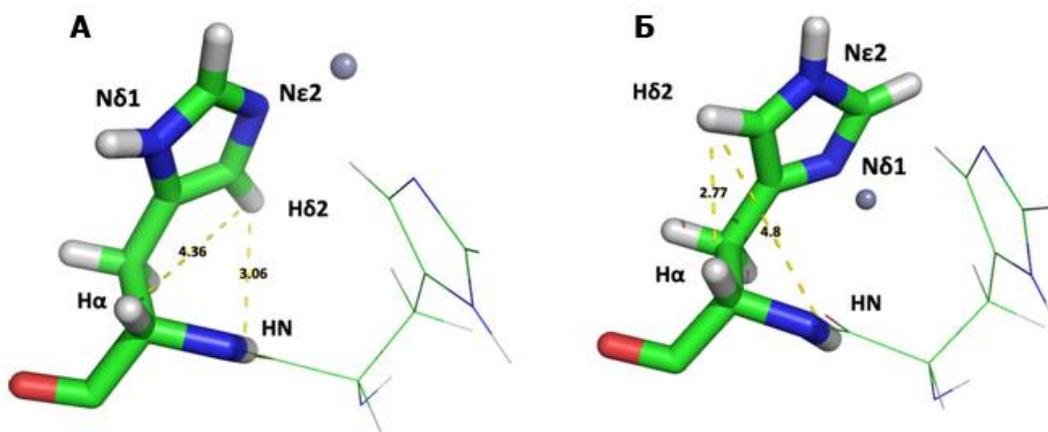


Рисунок 11. Иллюстрация двух возможных вариантов координации иона цинка аминокислотным остатком His14. Если ион цинка координирует атом азота N ϵ 2, то расстояние между H α и H δ 2 больше, чем расстояние между HN и H δ 2 (А). Если ион цинка координирует атом азота N δ 1, то расстояние между H α и H δ 2 меньше, чем расстояние между HN и H δ 2 (Б).

Набор ограничений на расстояния, полученные в результате анализа спектров ЯМР, и набор ограничений на геометрию центра хелатирования иона цинка, полученные в результате расчетов КМ/ММ, были использованы для определения структуры димерного комплекса пептида $\text{A}\beta^{\text{H6R}}(1-16)\cdot\text{Zn}^{2+}\cdot\text{A}\beta^{\text{H6R}}(1-16)$ (табл. 4). Расчеты проводили с помощью программы GROMACS по описанному ранее оптимизированному протоколу.

Таблица 4. Количество ограничений ЯМР, использованных для расчета структур, и статистика полученного семейства конформеров ЯМР.

Количество ЯЭО ограничений	173
Intra-residue	91
Sequential	55
Medium-range	23
Long-range ($ i-j >4$)	4
Количество ограничений хелатного центра	8
Статистика карты Рамачандрана	
Остатков в наиболее благоприятной области (%)	73.5
Остатков в запрещенной области (%)	0.0
Количество структур в семействе	20
Количество нарушений ЯЭО ($>0.5\text{\AA}$) на структуру	<1
СКО координат атомов C', C α and N при суперпозиции структур в семействе (\AA)	2.37 ± 0.89

Спектры ЯМР пептида $A\beta^{H6R}(1-16)$ содержат только один набор химических сдвигов, относящихся к димерной форме его комплекса с ионом цинка, следовательно, димер содержит две структурно идентичные аминокислотные цепи. На рисунке 12 представлено семейство из 20 структур димера $A\beta^{H6R}(1-16) \cdot Zn^{2+} \cdot A\beta^{H6R}(1-16)$. СКО координат тяжелых атомов основной цепи (C', C α , N и O) димера составляет $2.37 \pm 0.55 \text{\AA}$. Рассчитанное семейство было депонировано в базу данных белковых структур (PDB), идентификационный код 2MGT. Результаты отнесения ЯМР спектров были депонированы в Biological Magnetic Resonance Bank, идентификационный номер 19602. Репрезентативная структура семейства была дополнительно минимизирована методом КМ/ММ для уточнения геометрии окружения иона цинка.

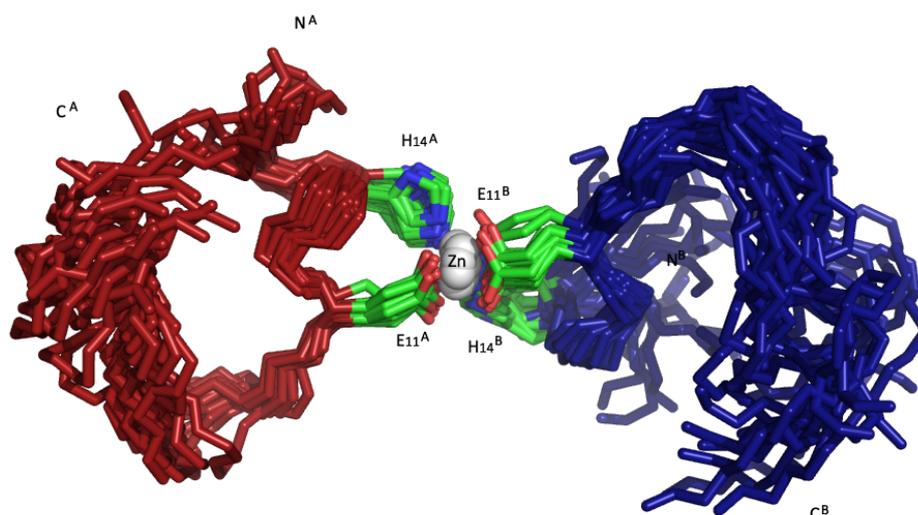


Рисунок 12. Структура димера $A\beta^{H6R}(1-16)$ с ионом Zn^{2+} в растворе (20 конформеров ЯМР, депонированных в банк данных PDB, код 2LI9). Показаны только атомы основной цепи (C α , C and N) и боковых цепей остатков Glu11 и His14. Цепи A и B димера окрашены в красный и синий цвет соответственно. Помечены положения N и C концевых аминокислотных остатков обеих цепей.

Модель олигомера $A\beta^{H6R}$

На основе полученной структуры димера $A\beta^{H6R}(1-16)\cdot Zn^{2+}\cdot A\beta^{H6R}(1-16)$ и ранее определенной структуры олигомера, состоящего из участков $A\beta(17-42)$ (модель Лурса), была рассчитана модель олигомера полноразмерного $A\beta^{H6R}$ в комплексе с Zn^{2+} . На начальном этапе моделирования была построена модель полноразмерного димера $A\beta^{H6R}$ в комплексе с Zn^{2+} путем сочленения димера $A\beta^{H6R}(1-16)\cdot Zn^{2+}\cdot A\beta^{H6R}(1-16)$ с двумя участками $A\beta(17-42)$ из модели Лурса.

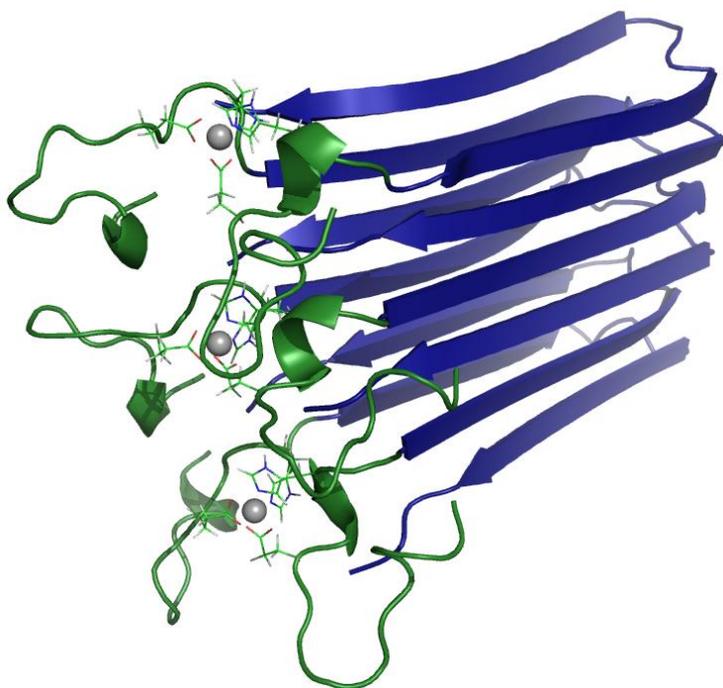


Рисунок 13. Модель олигомера $A\beta^{H6R}(1-16)/Zn^{2+}$. Синим цветом показаны участки 17-42 пептидов, образующих гидрофобное ядро олигомера. Зеленым и серым цветом показаны участки 1-16 пептидов и ионы цинка соответственно.

При построении модели полноразмерного димера были рассмотрены варианты параллельной и антипараллельной укладки β -листных участков $A\beta(17-42)$. В результате было установлено, что вследствие стерических препятствий на участке 1-16 возможна только антипараллельная β -лиственная укладка фрагментов 17-42 пептида в полноразмерной модели димера. Полученная модель была оптимизирована методом молекулярной динамики. В расчетах были использованы ограничения на расстояния для участков 1-16 и диэдральные углы для участков 17-42 пептидов. Для участков 18-42 были также заданы водородные связи, характерные для антипараллельного β -листа. Расчеты осуществлялись с помощью программного пакета GROMACS

4.5.4 и силового поля AMBER 03. Далее, путем сближения трех молекул димера была получена модель гексамера (рис. 13), структура которого была также оптимизирована описанным выше способом.

Считается, что координация иона цинка металлсвязывающим доменом является первым этапом процесса олигомеризации $A\beta$. Сближение двух молекул $A\beta^{H6R}$ благодаря димеризации в N-концевой области $A\beta^{H6R}$, по всей видимости, благоприятствует образованию β -складчатой структуры между C-концевыми участками $A\beta^{H6R}$. В результате этого процесса могут образовываться димеры, структура пептида в которых близка к структуре пептида в составе фибриллы, т.е. происходит префолдинг пептида, способствующий его дальнейшей олигомеризации. Следует отметить что указанный механизм описывает образование зародышей β -амилоидной фибриллы, а известно, что именно эта стадия является лимитирующей в процессе формирования β -амилоидных

фибрилл. Указанные факторы могут являться причиной повышенной склонности $A\beta^{H6R}$ к олигомеризации, что может объяснять патогенность английской мутации при БА.

Взаимодействие $A\beta^{D7iso}(1-16)$ с ионами Zn^{2+}

Как и в случае пептидов $A\beta^{H6R}(1-16)$ и $RatA\beta(1-16)$, изоформа $A\beta^{D7iso}(1-16)$ в растворе находится в мономерном состоянии в отсутствии ионов металлов. Об этом, в частности, свидетельствуют узкие сигналы в спектрах ЯМР свободного пептида даже при 5°C, что говорит о высокой подвижности полипептида в растворе и отсутствии агрегационных процессов.

Однако, при добавлении двукратного молярного избытка ионов цинка к раствору пептида в концентрации от 3 мМ и выше, при нейтральных значениях рН наблюдается выпадение белого осадка вследствие цинк-индуцируемой агрегации $A\beta^{D7iso}(1-16)$. Такие процессы не наблюдались для $A\beta^{H6R}(1-16)$ или $RatA\beta(1-16)$. Жидкость над осадком практически не содержала растворенной формы пептида. Спектры ЯМР- 1H , измеренные после добавления ионов цинка свидетельствуют о практически полном исчезновении пептида из раствора. Даже увеличение температуры до 25°C не привело к появлению сигналов, принадлежащих растворенной форме пептида. Процесс агрегации $A\beta^{D7iso}(1-16)$ при добавлении ионов цинка был исследован в диапазоне рН среды от 4 до 7. Установлено, что пептид остается в растворе лишь при значениях рН меньше 5. Осадок, выпавший при добавлении ионов цинка, растворялся лишь при понижении рН до 4-5. Повторное увеличение рН до 5.5 вновь приводило к образованию нерастворимого осадка.

Для подавления процессов агрегации пептида, были исследованы более разбавленные растворы. Так, после добавления двукратного молярного избытка $ZnCl_2$ к раствору пептида в концентрации 0.75 мМ при рН=7.2 и 5°C, наблюдается помутнение раствора без образования осадка. В спектрах ЯМР при этом удается наблюдать сигналы пептида. Наблюдается, в частности, существенное уширение сигналов, характерное для образования комплекса пептида с Zn^{2+} , аналогичное уширению, описанному выше для $A\beta^{H6R}(1-16)$ и $RatA\beta(1-16)$. Интенсивность сигналов в измеренных спектрах оказалась существенно ниже ожидаемой. Концентрация растворенного пептида уменьшилась вследствие агрегационных процессов, приводящих к помутнению раствора. Для оценки реальной концентрации растворенного пептида был проведен сравнительный анализ полученных спектров и спектров пептидов с близкой молекулярной массой. Установлено, что концентрация растворенной доли $A\beta^{D7iso}(1-16)$ в присутствии Zn^{2+} составила приблизительно 0.2 мМ.

ЯМР спектроскопия является относительно низко чувствительным методом, вследствие чего концентрация образца играет крайне важную роль. Сравнительно низкая концентрация пептида не позволяет получить качественные 2D спектры NOESY и детектировать малоинтенсивные кросс-пики, соответствующие диполь-дипольному взаимодействию протонов, принадлежащих аминокислотным остаткам удаленным друг от друга по белковой цепи. Вследствие этого

определить структуру комплекса $A\beta^{D7iso}(1-16)$ с ионами Zn^{2+} не представляется возможным.

Однако, сравнение спектров ЯМР пептида $A\beta^{D7iso}(1-16)$ в присутствии Zn^{2+} с аналогичными спектрами $A\beta^{H6R}(1-16)$ позволило установить определенное сходство между ними. Так, после добавления хлорида цинка в обоих случаях наблюдается появление сигнала метильной группы остатка Val12 при 0.2 м.д. (рис. 14, 15).

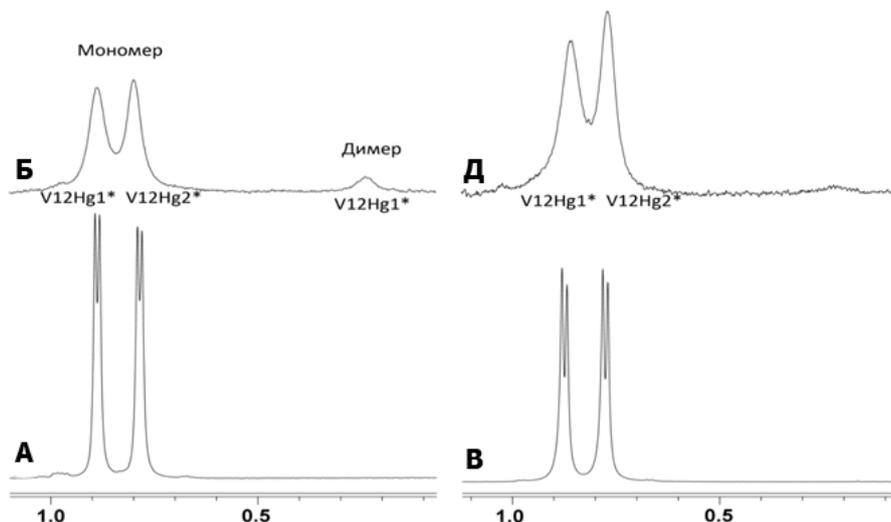


Рисунок 14. Сравнение фрагментов 1D спектра ЯМР $A\beta^{H6R}(1-16)$ и $A\beta^{D7iso}(1-16)$ в свободном состоянии и в присутствии ионов цинка. А – спектр $A\beta^{H6R}(1-16)$ в свободном состоянии, Б – спектр $A\beta^{H6R}(1-16)$ в присутствии Zn^{2+} , В – спектр $A\beta^{D7iso}(1-16)$ в свободном состоянии, Д – спектр $A\beta^{D7iso}(1-16)$ в присутствии Zn^{2+} .

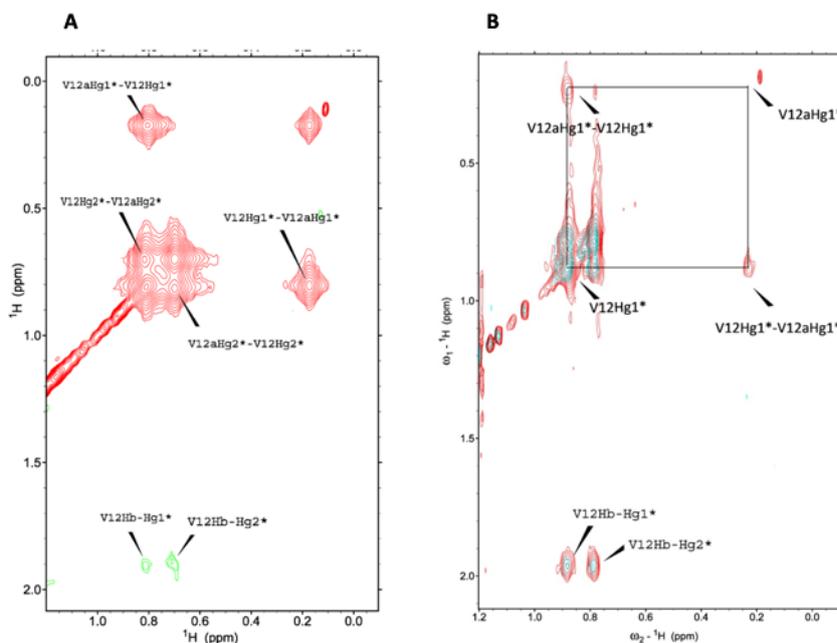


Рисунок 15. Сравнение фрагмента 2D спектра ROESY комплекса $A\beta^{H6R}(1-16)$ с Zn^{2+} (А) и фрагмента 2D спектра NOESY $A\beta^{D7iso}(1-16)$ в присутствии ионов цинка (В).

Кроме остатка Val12 наблюдается также и удвоение сигналов остатка Thr10, аналогичное тому, что детектируется в спектрах комплекса $A\beta^{H6R}(1-16)$ с ионами цинка. Однако в отличие от $A\beta^{H6R}(1-16)$, где содержание димерной формы, которой принадлежат указанные сигналы, достигает 30-35%, в случае $A\beta^{D7iso}(1-16)$ содержание димерной формы оказывается невелико (менее 5%). В значительной степени это обусловлено низкой концентрацией пептида. Вместе с тем, сходство химических сдвигов наблюдаемых сигналов с сигналами димера $A\beta^{H6R}(1-16) \cdot Zn^{2+} \cdot A\beta^{H6R}(1-16)$ позволяет предположить, что связывание Zn^{2+} с пептидом $A\beta^{D7iso}(1-16)$ также приводит к образованию димера с конформацией, схожей для этих двух пептидов. Однако, в случае $A\beta^{H6R}(1-16)$ фрагмент EVNH является единственным центром хелатирования ионов цинка, в то время как у пептида $A\beta^{D7iso}(1-16)$ имеется второй центр хелатирования, сформированный аминокислотными остатками His6 и isoAsp7. Это может приводить к цинк-зависимой олигомеризации пептида.

Таким образом, при низкой концентрации $A\beta^{D7iso}(1-16)$ межмолекулярное взаимодействие молекул пептида, индуцированное связыванием ионов цинка, может остановиться на стадии образования димера. Однако при повышении концентрации $A\beta^{D7iso}(1-16)$ протекают процессы цинк-зависимой олигомеризации с образованием агрегатов, нерастворимых в воде. По всей видимости, константы связывания двух молекул $A\beta^{D7iso}(1-16)$ друг с другом и молекулы $A\beta^{D7iso}(1-16)$ с уже образованным олигомером различаются таким образом, что афинность пептида по отношению к олигомеру существенно возрастает. Именно этим может объясняться факт отсутствия в растворе сколько-нибудь заметной концентрации пептида в том случае, когда его начальная концентрация в растворе была достаточно высокой (больше 1-2 мМ).

Представлялось целесообразным построить модель для олигомеров $A\beta^{D7iso}(1-16)$ при взаимодействии пептида с ионами цинка. Для этого предполагалось, что одним центром связывания может быть фрагмент EVNH (т.е. остатки Glu11 и His14, формирующие интерфейс димеризации пептида $A\beta^{H6R}(1-16)$), а вторым центром связывания могут быть остатки His6 и карбоксильная группа изоаспартата isoAsp7. На рисунке 16 представлены наиболее вероятные модели цинк индуцированных олигомеров $A\beta^{D7iso}(1-16)$. При моделировании олигомеров $A\beta^{D7iso}(1-16)$ был использован структурный мотив комплекса $A\beta^{H6R}(1-16)$ с ионами цинка.

Таким образом, для металлсвязывающих доменов трех изученных изоформ бета-амилоида Rat $A\beta(1-16)$, $A\beta^{H6R}(1-16)$ и $A\beta^{D7iso}(1-16)$ характер взаимодействия с ионами цинка существенным образом различается. Для Rat $A\beta(1-16)$ наблюдается образование димера, которое, впрочем, не может приводить к олигомеризации полноразмерного пептида. Для $A\beta^{H6R}(1-16)$ также наблюдается образование димера, но этот процесс облегчает дальнейшую олигомеризацию полноразмерного пептида $A\beta^{H6R}$. Для $A\beta^{D7iso}(1-16)$ наблюдается протекание агрегационных процессов уже на уровне металлсвязывающего домена. Очевидно, что для полноразмерной формы $A\beta^{D7iso}$ такие процессы должны протекать с еще более высокой скоростью.

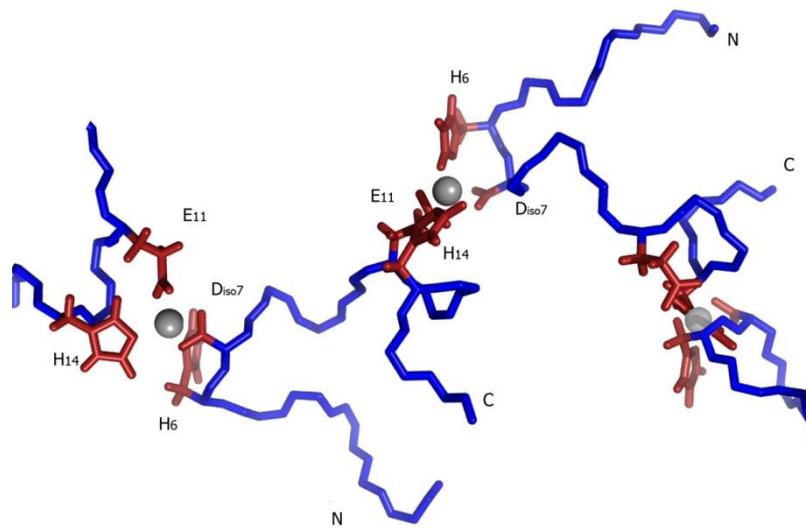
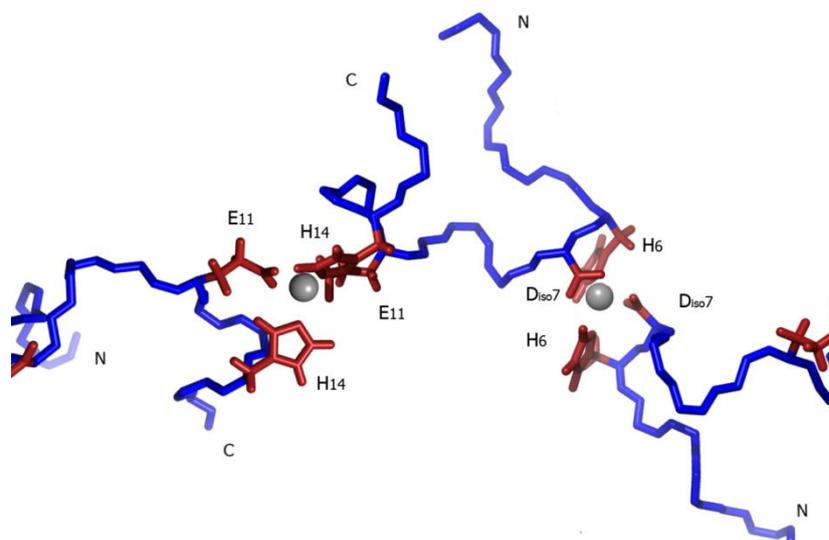
А**Б**

Рисунок 16. Модели олигомеров $A\beta^{D7iso}(1-16)$. А – сочленение мономерных звеньев осуществляется по принципу голова к голове, хвост к хвосту. Б – сочленение мономерных звеньев осуществляется по принципу голова к хвосту.

Выводы

1. Проведено отнесение сигналов ЯМР металлсвязывающих доменов $A\beta(1-16)$ крысы и изоформ $A\beta(1-16)$ человека в растворе в свободном состоянии и в комплексе с ионами цинка. Химические сдвиги ядер 1H , ^{13}C и ^{15}N депонированы в международный банк данных BioMagResBank (коды 17884 и 19602). Определены аминокислотные остатки пептидов, участвующие в координации ионов цинка, и стехиометрия взаимодействия исследованных пептидов с Zn^{2+} .
2. Разработан эффективный протокол расчета структуры небольших пептидов в явно выраженном водном окружении методом молекулярной динамики с использованием ограничений на межъядерные расстояния и диэдральные углы, полученных на основании данных ЯМР.

3. Рассчитаны семейства структур ЯМР цинк-индуцированных димеров металлсвязывающего домена $A\beta(1-16)$ крысы и изоформы $A\beta^{H6R}(1-16)$ человека, соответствующей продукту т.н. английской мутации. Координаты атомов депонированы в банк белковых структур (коды 2LI9 и 2MGT). Выявлены особенности строения комплексов металлсвязывающего домена $A\beta$ крысы с ионами цинка, объясняющие феномен устойчивости крыс к болезни Альцгеймера.
4. Обнаружено структурное сходство комплексов металлсвязывающих доменов двух патогенных форм бета-амилоида человека ($A\beta^{H6R}(1-16)$ и $A\beta^{D7iso}(1-16)$) с ионами цинка и их принципиальное различие от аналогичного комплекса $A\beta(1-16)$ крысы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что строение металлсвязывающего домена $A\beta$ играет ключевую роль в агрегационных процессах, сопровождающих развитие болезни Альцгеймера.
5. Показано, что фрагмент $^{11}EVNH^{14}$ образует интерфейс цинк-зависимой димеризации патогенных вариантов бета-амилоида человека, что открывает перспективы использования этого фрагмента в качестве лекарственной мишени для поиска средств анти-агрегационной терапии БА.

Материалы работы изложены в следующих публикациях

1. **А.Н. Истрате**, А.Б. Манцызов, С.А. Козин, В.И. Польшаков. Оптимизация метода расчета структуры пептидов в растворе по данным спектроскопии ЯМР, *Мол. Биол.* 2010. **44**(6): С. 1075-1085.
2. **A.N. Istrate**, P.O. Tsvetkov, A.B. Mantsyzov, A.A. Kulikova, S.A. Kozin, A.A. Makarov, and V.I. Polshakov. NMR solution structure of rat abeta(1-16): toward understanding the mechanism of rats' resistance to Alzheimer's disease, *Biophys J.* 2012. **102** (1): P. 136-143.
3. S.A. Kozin, P.O. Tsvetkov, A.A. Kulikova, M. Indeikina, Y. Mezentsev, **A.N. Istrate**, I. Popov, A. Ivanov, V.I. Polshakov and A.A. Makarov Zinc-induced dimers of chemically modified β - are possible aggregation seeds. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association.* 2014. **10**(4): P. P793.

Тезисы конференций

1. **A.N. Istrate**, A.B. Mantsyzov, S.A. Kozin, V.I. Polshakov, NMR assignments of the short peptides of the fragments of human and rat β -amyloid. *The proceedings of International Youth Scientific School "Actual problems of magnetic resonance and its application"*, 5-8 October, 2009, Kazan, Russia, p.164.
2. **А.Н. Истрате**, А.Б. Манцызов, С.А. Козин, В. И. Польшаков. Отнесение сигналов ЯМР и расчет структур фрагментов человеческого и крысиного бета-амилоида. *Труды Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2010»*, 12-15 апреля, 2010, Москва, Россия.

3. **A.N. Istrate**, P.O. Tsvetkov, A.B. Mantsyzov, A.A. Kulikova, S.A. Kozin, A.A. Makarov and V.P. Polshakov. Solution structure of rat A β (1-16) and the mechanism of rats' resistance to Alzheimer's disease, *The proceedings of XXVth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*, 19-24 August, 2012, Lyon, France, p. 230.
4. A.A. Kulikova and **A.N. Istrate**. NMR solution structure of rat beta amyloid metal-binding domain: new insights into the mechanisms of rats' resistance to Alzheimer's disease. *Book of abstracts of the FEBS Congress "Mechanisms in Biology"*, 6-11 July, 2013, St. Petersburg, Russia, p. 418.
5. A.B. Mantsyzov, **A.N. Istrate**, V. I. Polshakov. Optimization of the protocol for small peptide solution structure refinement using NMR restraints in the bath of explicit water, p. 128, *Book of abstracts of the international conference "Magnetic resonance: fundamental research and pioneering applications"*, 23-27 June, 2014, Kazan, Russia, p. 128.
6. S.S. Zhokhov, **A.N. Istrate**, S.A. Kozin, V.I. Polshakov. NMR evidence for zinc-induced dimerization of beta-amyloid peptide metal binding domain with English mutation, p. 158, *Book of abstracts of the international conference "Magnetic resonance: fundamental research and pioneering applications"*, 23-27 June, 2014, Kazan, Russia, p158.
7. **A.N. Istrate**, S.A. Zhokhov, A.A. Kulikova, P.O. Tsvetkov, S.A. Kozin, A.A. Makarov, V. P. Polshakov. NMR solution structure of the English mutant of the β -amyloid peptide metal binding domain A β (1-16)H6R and its impact on A β oligomerization, *The proceedings of international conference EUROMAR-2014*, ETH Zurich, Switzerland, 29 June - 3 July, 2014, p. 280.