

СТРУКТУРА АМИЛОИДОГЕННЫХ β -ПЕПТИДОВ В КОМПЛЕКСЕ С МОДЕЛЬНЫМИ МЕМБРАНАМИ

© К. С. Усачев,¹ А. В. Филиппов, В. В. Клочков

Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Лаборатория ЯМР-спектроскопии биологических систем;
¹ электронный адрес: k.usachev@kpfu.ru

Путем анализа экспериментальных данных ЯМР определены структуры комплексов амилоидогенных β -пептидов ($A\beta_{1-40}$, $A\beta_{10-35}$, $A\beta_{13-23}$, $A\beta_{16-22}$) с модельными биологическими мембранами на основе мицелл додецилсульфата натрия в растворе. Установлено, что процесс комплексообразования $A\beta$ -пептидов с мицеллами происходит во всех случаях посредством аминокислотных остатков L17, F19, F20 и G29—M35.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, бета-амилоид, ЯМР, мицелла ДСН.

Принятые сокращения: ДСН — додецилсульфат натрия, ЯМР — ядерный магнитный резонанс.

Болезнь Альцгеймера (также и сенильная деменция альцгеймеровского типа) — неизлечимое нейродегенеративное заболевание, характеризующееся накоплением β -амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков в тканях головного мозга (Hardy, Selkoe, 2002). Нейротоксичное действие $A\beta$ -пептидов осуществляется через их взаимодействие с клеточной мембраной. Предполагается, что $A\beta$ -пептиды непосредственно нарушают работу мембран нейронов, вызывая образование пор, что приводит к изменениям ионного гомеостаза (Rauk, 2008). Поэтому описание пространственного строения комплекса $A\beta$ -пептид—мембрана, а также структура $A\beta$ -пептидов в растворе позволят подойти к пониманию механизмов, работающих на поверхности клеток, что может помочь поиску лекарственных препаратов, ингибирующих образование сенильных бляшек.

В качестве объектов настоящего исследования были выбраны следующие $A\beta$ -пептиды: $A\beta_{1-40}$ (DAEFRHDSGYEVNHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV); $A\beta_{10-35}$ (YEVNHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLM), в состав которого входит центральный гидрофобный кластер (Zhang et al., 2000; Usachev et al., 2013a); $A\beta_{13-23}$ (NHQKLVFFAED), который содержит сайты связывания холестерина, аполипопротеинов (apoE) и алкогольдегидрогеназы (ABAD) (участок аминокислотных остатков с V12 по D23), а также содержит область аминокислотной последовательности с высокой степенью сродства к энзимам и каталазам (I31-M35) (Jarvet et al., 2000; Usachev et al., 2013b); $A\beta_{16-22}$ (Ac-KLVFFAE-NH₂), который, как предполагается, является самостоятельным сайтом связывания олигомеров, а также содержит предполагаемый центр агрегации (Balbach et al., 2000; Usachev et al., 2012).

На основе экспериментально установленных межростонных расстояний, определенных из ЯМР NOESY-спек-

тров, и расчетов методом молекулярной динамики определены структуры комплексов $A\beta$ -пептидов с модельными биологическими мембранами на основе ДСН (Tulumello, Deber, 2009; Warschawski et al., 2011) в растворе. Установлено, что процесс комплексообразования $A\beta$ -пептидов с мицеллами происходит во всех случаях посредством аминокислотных остатков L17, F19, F20 и G29-M35.

Материал и методика

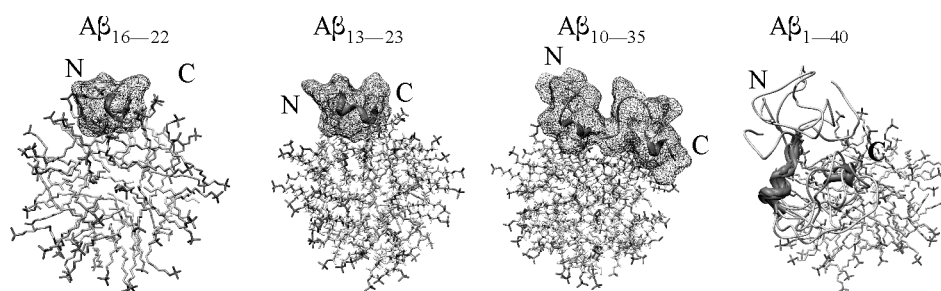
Для работы использовали следующие реактивы: аминокислоты, защищенные 9-флуоренилметокси-карбонильными группами, смесь с градиентом вода—ацетонитрил, предейтерированный ДСН (полнота замещения протонов на ядра дейтерия 98 %), D₂O. Реактивы были от фирмы Aldrich (США) или отечественного производства квалификации х. ч.

Синтез исследуемых пептидов выполняли методом твердофазного синтеза с помощью автоматического синтезатора пептидов ABI 433A (Applied Biosystems, США) при использовании аминокислот, защищенных 9-флуоренилметокси-карбонильными группами, и контролем за процессом по проводимости реакционной смеси. Очистку пептидов проводили методом высокопроизводительной жидкостной хроматографии на приборе Series 200 Perkin Elmer HPLC System (Waltham, США) в градиенте вода—ацетонитрил. Качество конечного продукта характеризовали методом MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption-ionization) масс-спектрометрии. Пептид хранили при –75 °С до использования.

Во избежание агрегации концентрация пептидов в ЯМР-ампуле была менее 300 мкМ. Концентрация мицелл ДСН в водном растворе (90 % H₂O + 10 % D₂O) составля-

Рис. 1. Аминокислотная последовательность бета-амилоида $A\beta_{1-40}$.

Серыми прямоугольниками отмечены участки, у которых наблюдали вторичную структуру в виде 3_{10} -спирали в растворе с мицеллами ДСН.

Рис. 2. Структура комплексов $A\beta$ -пептид—мицелла для пептидов $A\beta_{16-22}$, $A\beta_{13-23}$, $A\beta_{10-35}$ и $A\beta_{1-40}$.

ла 10 мМ. Исследуемые пептиды растворяли в мицелярном растворе непосредственно перед проведением спектрометрии ЯМР.

Регистрацию одномерных и двумерных (^1H - ^1H) спектров ЯМР в растворах проводили на ЯМР-спектрометре AVANCE II-500 (Bruker Biospin, Faellanden, Швейцария) (500 МГц (^1H)) при температуре 293 К. Для отношения сигналов в спектрах ЯМР ^1H использовали подход, основанный на совместном применении TOCSY и NOESY. Параметр времени смешивания τ_m в экспериментах NOESY составлял 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 и 800 мс.

Результаты и обсуждение

В предыдущих работах (Usachev et al., 2012, 2013a, 2013b) на основе анализа двумерных NOESY-спектров ЯМР пептидов $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{10-35}$, $A\beta_{13-23}$ и $A\beta_{16-22}$ в растворе с мицеллами ДСН было установлено наличие упорядоченных участков в виде 3_{10} -спиралей (аминокислотные остатки 13—23, 29—35) (рис. 1).

В спектрах ^1H ЯМР пептидов $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{10-35}$, $A\beta_{13-23}$ и $A\beta_{16-22}$ в водном растворе и в растворе с мицеллами ДСН наблюдали изменение химических сдвигов протонов α - и β -групп для участков аминокислотной последовательности 13—23, 29—35. Например, для α - и β -групп аминокислотных остатков F19, F20 и L17 пептида $A\beta_{16-22}$ наблюдали смещение химических сдвигов в область сильных полей (L17(H_α): в растворе 20 мМ фосфатного буфера 4.36 м. д.; в растворе ДСН 4.30 м. д.), а химические сдвиги α - и β -групп K16, V18 и E22 сместились в слабые поля (V18(H_β): в растворе 20 мМ фосфатного буфера 1.94 м. д.; в растворе ДСН 1.96 м. д.), что объяснимо взаимодействием данных аминокислотных остатков пептидов с электроотрицательно заряженной поверхностью мицеллы в комплексах. Кроме того, анализ гидрофобной поверхности исследуемых пептидов в растворе с мицеллами ДСН в отличие от структур в растворе 20 мМ фосфатного буфера показывает наличие выраженных гидро-

фобных областей для аминокислотных остатков 13—23 и 29—35. На основе анализа указанных выше данных была построена модель исследуемого комплекса «пептид—мицелла» путем ориентации к заряженной поверхности мицеллы гидрофобных областей пептидов $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{10-35}$, $A\beta_{13-23}$ и $A\beta_{16-22}$. Установлено, что указанные пептиды образуют комплекс с мицеллой ДСН двумя гидрофобными участками (аминокислотные остатки 13—20 и 29—35), а также то, что взаимодействие пептида с заряженной поверхностью мицеллы происходит посредством аминокислотных остатков L17, F19 и F20 и 29—35 (рис. 2).

Полученные данные о пространственном строении $A\beta$ -пептидов в связанном с модельной биологической мембраной состоянии позволяют строить обоснованные модели того, как молекула бета-амилоида может размещаться в клеточной мембране и взаимодействовать с другими молекулами, такими как интегральные белки. Взаимодействие $A\beta$ -пептидов с поверхностью модельной мембраны посредством образования 3_{10} -спиралей может являться подтверждением механизма образования пор, нарушающих работу мембран нейронов.

Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках государственной программы поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-31029 мол_а).

Список литературы

Balbach J. J., Ishii Y., Antzutkin O. N., Leapman R. D., Rizo N. W., Dyda F., Reed J., Tycko R. 2000. Amyloid fibril formation by A beta(16–22), a seven-residue fragment of the Alzheimer's beta-amyloid peptide, and structural characterization by solid state NMR. *Biochemistry*. 39 : 13748–13759.

Hardy J., Selkoe D. J. 2002. Medicine — the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 297 : 353–356.

Jarvet J., Danielsson J., Damberg P., Oleszczuk M., Graeslund A. 2007. Positioning of the Alzheimer A beta(1–40) peptide in SDS micelles using NMR and paramagnetic probes. *J. Biomol. NMR*. 39 : 63–72.

Rauk A. 2008. Why is the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease neurotoxic? *Dalton Trans.* 10 : 1273–1282.

Tulumello D. V., Deber C. M. 2009. SDS micelles as a membrane-mimetic environment for transmembrane segments. *Biochemistry*. 48 : 12096–103.

Usachev K. S., Efimov S. V., Yulmetov A. R., Filippov A. V., Antzutkin O. N., Afonin S., Klochkov V. V. 2012. Spatial structure of heptapeptide A β _{16–22} (beta-amyloid A β _{1–40} active fragment) in solution and in complex with a biological membrane model. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 61 : 779–834.

Usachev K. S., Filippov A. V., Antzutkin O. N., Klochkov V. V. 2013a. Use of a combination of the RDC method and NOESY NMR spectroscopy to determine the structure of Alzheimer's

amyloid Ab10–35 peptide in solution and in SDS micelles. *Eur. Biophys. J.* 42 : 803–810.

Usachev K. S., Filippov A. V., Filippova E. A., Antzutkin O. N., Klochkov V. V. 2013b. Solution structures of Alzheimer's amyloid A β _{13–23} peptide: NMR studies in solution and in SDS. *J. Mol. Struct.* 1049 : 436–440.

Warschawski D. E., Arnold A. A., Beaugrand M., Gravel A., Chartrand E., Marcotte I. 2011. Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins. *Biochim. biophys. acta.* 1808 : 1957–1974.

Zhang S., Iwata K., Lachenmann M. J., Peng J. W., Li S., Stimson E. R., Lu Y., Felix A. M., Maggio J. E., Lee J. P. 2000. The Alzheimer's peptide A beta adopts a collapsed coil structure in water. *J. Struct. Biol.* 130 : 130–141.

Поступила 4 II 2014

STRUCTURE OF AMYLOID-BETA PEPTIDES IN A COMPLEX WITH MODEL MEMBRANES

K. S. Usachev,¹ A. V. Filippov, V. V. Klochkov

Kazan (Volga Region) Federal University, Laboratory for NMR Spectroscopy of Biological Systems;

¹ e-mail: k.usachev@kpfu.ru

Structures of amyloid-beta peptides A β _{1–40}, A β _{10–35}, A β _{13–23} and A β _{16–22} in a complex with model membranes in solution were obtained on the analysis of NMR experimental data. It has been established that the process of peptide-micelle complex formation occurs through the amino acid residues L17, F19, F20 and G29–M35.

Key words: Alzheimer disease, beta-amyloid, NMR, SDS micelle.