

УДК 577.2

Пространственная структура и динамика трансмембранного домена белка-предшественника β -амилоида

К. Д. Надеждин, О. В. Бочарова, Э. В. Бочаров*, А. С. Арсеньев

Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: bon@nmr.ru

Поступила в редакцию 28.10.2010 г.

РЕФЕРАТ Для адекватной терапии болезни Альцгеймера, которая поражает людей во всем мире независимо от национальности и социально-экономического статуса, необходимо понимать молекулярные основы патогенеза этого заболевания. Амилоидный β -пептид, формирующий амилоидные бляшки в головном мозге при болезни Альцгеймера, образуется в результате последовательного расщепления мембранного белка-предшественника β -амилоида (amyloid precursor protein – APP). Более половины мутаций APP, обнаруженных при семейных формах болезни Альцгеймера, локализованы в его трансмембранном домене. Патогенные мутации, как предполагают, влияют на структурно-динамические свойства трансмембранного домена APP, изменяя его конформационную стабильность и/или латеральную димеризацию. В настоящей работе методами ЯМР-спектроскопии в среде, имитирующей мембранное окружение, – детергентных мицеллах, определены пространственная структура и динамика рекомбинантного пептида, соответствующего фрагменту APP Glu686–Lys726, который включает трансмембранный домен APP с прилегающим N-концевым примембранным участком. Структура, полученная в мицеллах додецилфосфохолина, представляет собой две α -спирали: короткая амфифильная примембранная Lys687–Asp694 и длинная трансмембранная Gly700–Leu723, соединенные подвижным петлевым участком. В районе спаренных остатков Gly708–Gly709 наблюдается небольшое искривление трансмембранной α -спирали. Под петлевым участком в области контакта примембранной α -спирали с поверхностью мембраны рядом с N-концом трансмембранной α -спирали, по-видимому, образуется гидрофобная полость, предназначенная для взаимодействия APP с холестерином.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА болезнь Альцгеймера, белок-предшественник β -амилоида, трансмембранный домен, ЯМР-спектроскопия, пространственная структура, динамика.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ APP – белок-предшественник β -амилоида (amyloid precursor protein); A β – амилоидный β -пептид; TM – трансмембранный (transmembrane); JM – примембранный (juxtamembrane), APPjmtm – фрагмент APP₆₈₆₋₇₂₆; ДФХ – додецилфосфохолин; ДСК – доксилстеариновая кислота; ЯЭО (NOE) – ядерный эффект Оверхаузера (nuclear Overhauser effect); NOESY – ЯМР-спектроскопия ЯЭО; HSQC – гетероядерная одноквантовая корреляция.

ВВЕДЕНИЕ

Более века назад немецкий врач А. Альцгеймер описал дегенеративное заболевание головного мозга, проявляющееся в избирательной дегенерации нейронов в участках коры головного мозга, ответственных за когнитивное восприятие и память [1]. Возможно как наследование заболевания, так и его спорадическое развитие, причем в раннем возрасте обычно проявляются наследственные, так называемые семейные формы болезни Альцгеймера. Несмотря на определенный прогресс в изучении молекулярных основ патогенеза болезни Альцгеймера [2], современная терапия может лишь замедлить прогрессирование заболевания, но не излечить от него.

По мере развития болезни в местах контакта нейронов вне нервных клеток накапливается амилоидный β -пептид (A β), который собирается в упорядоченные тяжи, фибриллы, образующие так называемые амилоидные бляшки [1]. Присутствие гидрофобных белковых агрегатов приводит к нарушению передачи нервного импульса [1, 3, 4]. A β образуется в результате последовательного расщепления мембранного гликопротеина, предшественника β -амилоида (amyloid precursor protein – APP) β - и γ -секретазами [1, 5]. Недавно показано, что A β обладает мощной антимикробной активностью и, возможно, входит в систему врожденного иммунитета в нервной системе человека [6]. В организме A β вырабатывается в небольших

количествах и имеет длину от 38 до 43 а.о., при этом наиболее распространенные изоформы состоят из 40 и 42 а.о. [1, 3, 4]. Низкое в норме количественное соотношение пептидов $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ (около 1/9) сильно возрастает при болезни Альцгеймера, что приводит к появлению амилоидных бляшек, в основе образования которых лежит структурное изменение $A\beta$ [1, 3, 4]. В то же время ряд экспериментальных данных свидетельствует о том, что олигомерные формы $A\beta$ (в том числе внутриклеточные) могут оказывать нейротоксичный эффект еще до формирования фибрилл и бляшек [1, 3, 4].

APP димеризуется в плазматической мембране и имеет многодоменную структуру интегрального битопного белка [7]. При семейных формах болезни Альцгеймера более половины всех мутаций в APP приходится на его трансмембранный (ТМ) домен и примембранные участки [8, 9]. На сегодняшний день выдвинута гипотеза о том, что эти патогенные мутации влияют на латеральную димеризацию APP в мембране, изменяя конформацию димера и/или его стабильность, что рассматривается как вероятная причина альтернативного расщепления APP γ -секретазой в мембране и преобладания патогенного $A\beta_{1-42}$ над $A\beta_{1-40}$ [9–11]. Вместе с тем показано, что ТМ-домен APP и его примембранные участки специфически взаимодействуют с мембранным окружением, в частности с холестерином, а также с катионами металлов Cu^{2+} и Zn^{2+} , что может влиять на структурно-динамические свойства и димеризацию APP [12–15]. Таким образом, для понимания молекулярных механизмов патогенеза болезни Альцгеймера необходимо установить пространственную организацию не только пептидов $A\beta$ и их агрегатов, но и самого белка APP, и его ТМ-домена в частности. Тем не менее, несмотря на определенные успехи в структурно-динамических исследованиях амилоидных пептидов $A\beta$, на сегодняшний день существуют только теоретические пространственные модели ТМ-домена APP и его мутантных патогенных форм. В настоящей работе методами гетероядерной ЯМР-спектроскопии в мембраноподобной среде установлена пространственная структура и описана динамика ТМ-домена APP с примембранным (juxtamembrane – JM) участком, встроенного в виде мономера в детергентные мицеллы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приготовление ЯМР-образцов ТМ-домена APP в мембраноподобной среде

Необходимые для ЯМР-исследований количества изотопно-меченного по ядрам ^{15}N и ^{13}C образца рекомбинантного пептида APPjmtm, соответствующего

фрагменту APP Gln686–Lys726 с дополнительными N-концевыми остатками Gly–Ser, оставшимися после расщепления гибридного белка тромбином, получены по методике, описанной в [16]. Чистоту препаратов контролировали с помощью спектров $^1H/^{15}N$ -HSQC изотопно-меченных APPjmtm, растворенных в 500 мкл смеси хлороформ–метанол–вода 5 : 5 : 1 с концентрацией пептида 0.3 мМ. На основе скрининга состава мембраномоделирующей среды для последующих структурных ЯМР-исследований APPjmtm были выбраны детергентные мицеллы из додецилфосфохолина (ДФХ) [16]. Сухие препараты APPjmtm и ДФХ растворяли в смеси трифторэтанол–вода 1 : 1, озвучивали в течение нескольких минут в ультразвуковой бане, лиофилизировали и растворяли в 20 мМ ацетатном буфере (рН 5.0, 5% D_2O). Для предотвращения заражения бактериями в образцы добавляли 0.05 мМ NaN_3 , а для ингибирования фосфолипаз – 1 мМ EDTA. Для большей однородности размера мицелл проводили несколько циклов замораживания и нагревания до 40–45°C с последующим озвучиванием в ультразвуковой бане для достижения полной прозрачности раствора. Все образцы готовили из расчета 0.3–1 мМ APPjmtm в 400 мкл раствора мицелл с молярным соотношением пептид–детергент 1 : 70, что обеспечивает содержание примерно одного пептида на мицеллу, при этом концентрация ДФХ была в несколько раз выше критической концентрации мицеллообразования (~1 мМ). Приготовленные образцы помещали в ЯМР-ампулы Shigemi со стеклянным плунжером, качество образцов оценивали при помощи двухмерных ЯМР-спектров $^1H/^{15}N$ -HSQC. Варьирование рН и температуры показало, что лучшие с точки зрения разрешения сигналов ЯМР-спектры APPjmtm, солюбилизованного в мицеллах ДФХ, получаются при рН 4.3–5.3 и температуре 40–50°C.

ЯМР-спектроскопия ТМ-домена APP в мембраноподобной среде

ЯМР-спектры APPjmtm, солюбилизованного в мицеллах ДФХ при рН 4.6 и 45°C, получены на снабженных криодатчиками спектрометрах AVANCE III (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Германия) с рабочими частотами на протонах 600 и 800 МГц. Спектры обрабатывали в программе TOPSPIN 3.0 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Германия). ЯМР-спектры анализировали с использованием программы CARRA [17]. Для отнесения 1H -, ^{13}C - и ^{15}N -резонансов пептида и получения структурной информации (отнесение и интегрирование кросс-пиков ЯЭО) использовали набор из двух- и трехмерных спектров: $^1H/^{15}N$ -HSQC, $^1H/^{13}C$ -HSQC; $^1H/^{13}C/^{15}N$ -HNCA, $^1H/^{13}C/^{15}N$ -HN(CO)CA, $^1H/^{15}N$ -HNHA, $^1H/^{13}C/^{15}N$ -HNCO, $^1H/^{15}N$ -NOESY-HSQC, $^1H/^{13}C$ -TOCSY-HSQC, $^1H/^{13}C$ -NOESY-HSQC [18]. Ин-

формация о внутримолекулярной динамике пептида получена на основе анализа ^{15}N -релаксационных данных. Для этого значения гетероядерного $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ ЯЭО, времена продольной (T_1) и поперечной (T_2) релаксации, а также время вращательной корреляции (τ_R) для ^{15}N -меченного образца APPjmtm измеряли по методике, описанной в [19]. Значения времен обмена амидных протонов основной цепи пептида на дейтерий растворителя оценивали по изменению интенсивностей сигналов в наборе спектров $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC, последовательно накопленных через 1, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 18 и 24 ч для растворенного в D_2O предварительно лиофилизированного образца APPjmtm, встроенного в мицеллы. Степень пространственной удаленности аминокислотного остатка от поверхности и центра мицеллы определяли из уширения сигналов от амидных групп APPjmtm в спектрах $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC при последовательном добавлении парамагнитных спиновых меток 5- и 16-доксилстеариновых кислот (5- и 16-ДСК) соответственно, в соотношении 0,5, 1 и 2 метки на одну мицеллу ДФХ. Остатки APPjmtm, участвующие в связывании холестерина, идентифицировали, анализируя изменения обобщенных химических сдвигов $\Delta\delta_{[\text{HN}]}$ (вычисляемых как квадратный корень суммы квадратов изменений химических сдвигов сигналов ^1H ($\Delta\delta_{^1\text{H}}$) и ^{15}N ($\Delta\delta_{^{15}\text{N}}/5$) [13]) кросс-пиков амидных групп в спектрах $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC, вызванных добавлением холестерилгемисукцината (аналог холестерина) из расчета одна молекула гемисукцината на одну мицеллу ДФХ.

Расчет пространственной структуры ТМ-домена APP

Пространственная структура APPjmtm получена по стандартной методике [18]. Расчет пространственной структуры по данным спектроскопии ЯМР осуществлен в программе CYANA 2.1 [20] с использованием метода молекулярной динамики в пространстве торсионных углов и алгоритма “моделируемого отжига” (simulated annealing). Ограничения на межпротонные расстояния, используемые при расчете структуры, получены из объемов кросс-пиков ЯЭО в спектрах $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC и $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC, накопленных со временем смешивания $t_m = 80$ мс. Ограничения на двугранные углы получены из значений ^1H , ^{15}N и ^{13}C химических сдвигов NH-, CαH- и CO-групп APPjmtm в программе TALOS [21]. Ограничения на водородные связи добавлены после предварительного расчета структуры из анализа пространственной близости амидных протонов и атомов кислорода основной цепи APPjmtm согласно критерию для углов $140^\circ < \text{NHO} < 180^\circ$ и $130^\circ < \text{COH} < 170^\circ$ и для расстояний $1.9 \text{ \AA} \leq d(\text{O}, \text{H}^{\text{N}}) \leq 2.3 \text{ \AA}$, $3.0 \text{ \AA} \leq d(\text{O}, \text{N}) \leq 3.4 \text{ \AA}$, $3.2 \text{ \AA} \leq d(\text{C}, \text{H}^{\text{N}}) \leq 3.6 \text{ \AA}$ [22]. В результате

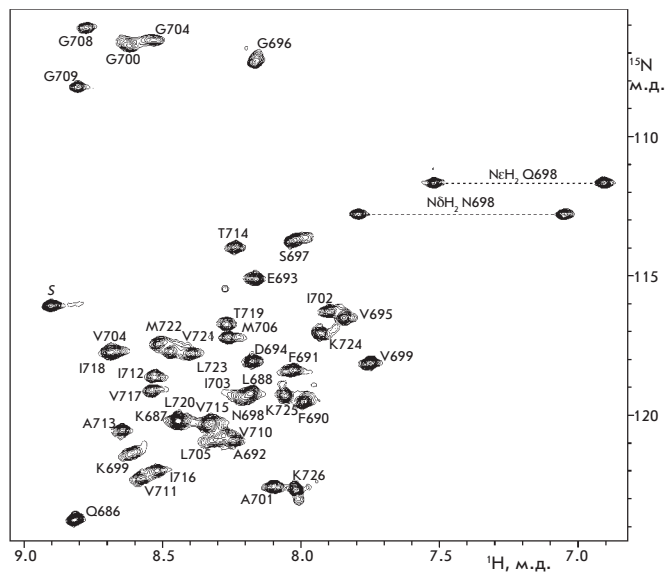


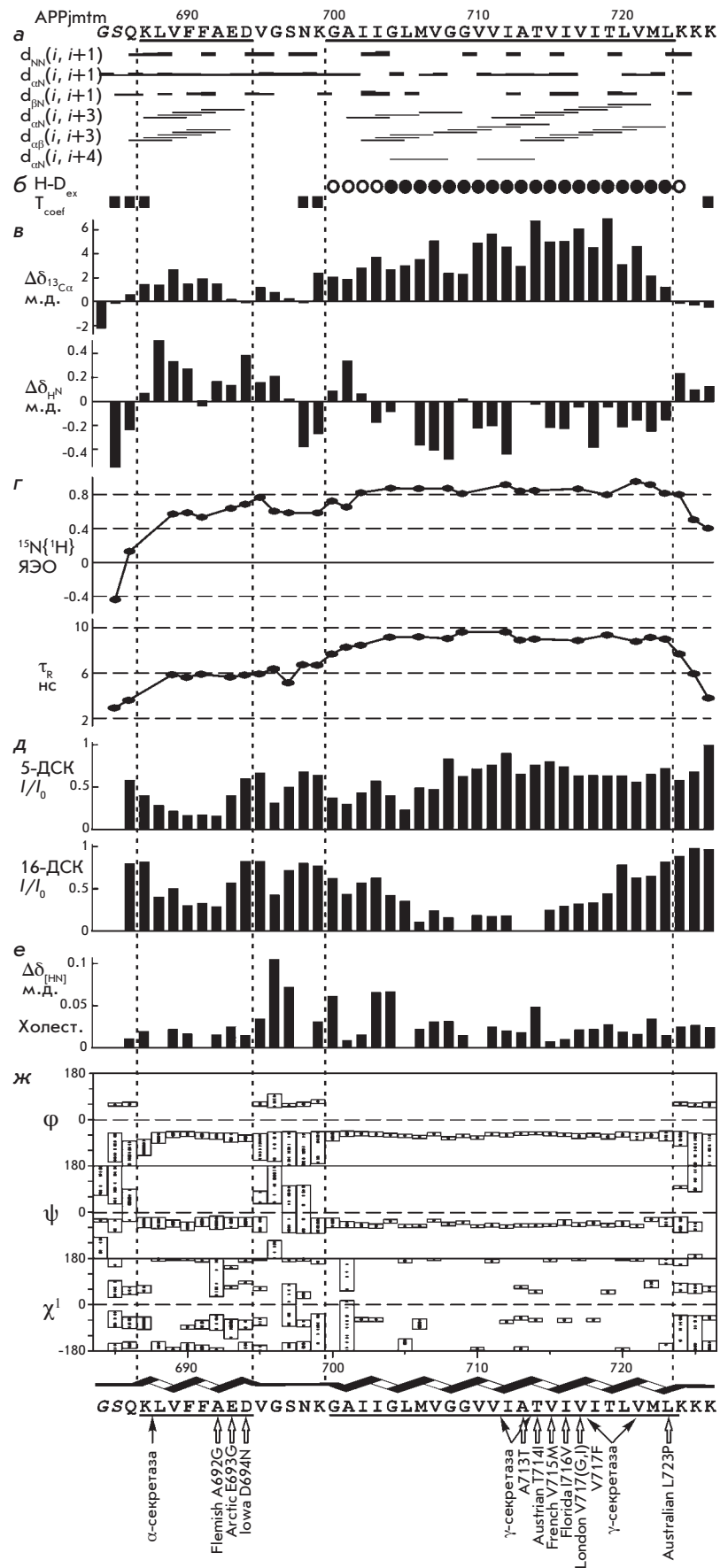
Рис. 1. Гетероядерный ЯМР-спектр $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC рекомбинантного totally $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -меченного пептида APPjmtm, солюбилизованного в водной суспензии мицелл ДФХ с молярным отношением пептид–детергент 1 : 70, pH 4.6, 45°C. Приведено отнесение сигналов от ^{15}NH -групп APPjmtm.

на основе верхних ограничений на межпротонные расстояния, на двугранные углы ϕ , ψ и χ^1 , на водородные связи с учетом стереоспецифического отнесения групп пептида рассчитан набор из 100 структур APPjmtm, из которых в качестве репрезентативных выбраны 20 структур с наименьшей штрафной функцией. Анализ и визуализация рассчитанных структур APPjmtm были проведены с помощью программ CYANA и MOLMOL [23].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантный пептид APPjmtm, содержащий ТМ-домен APP с прилегающим N-концевым приемлемым участком, изучали методами гетероядерной ЯМР-спектроскопии в мембраноподобной среде в виде водной суспензии мицелл ДФХ с молярным соотношением пептид–детергент 1 : 70 (соответствующим примерно одному пептиду на мицеллу) при pH 4.6 и 45°C. Интересно, что APP расщепляется в клеточных эндосомах со значением pH около 5 [13]. Образцы APPjmtm в мицеллах ДФХ были стабильными при 45°C в течение месяца, что приемлемо для структурных ЯМР-исследований. В спектре $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC (рис. 1) общее количество кросс-пиков от амидных групп совпадало с ожидаемым, исходя из первичной структуры APPjmtm. Это указывает на отсутствие медленного в шкале ЯМР конфор-

Рис. 2. Структурно-динамические данные ЯМР для APPjmtm. *а* – Межпротонные контакты ЯЭО, наблюдаемые между остатками APPjmtm в спектрах $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC и $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC, накопленных со временем смешивания $t_m = 80$ мс. *б* – Доступность амидных групп APPjmtm водному окружению мицеллы. *Сверху* представлены данные о временах полуобмена, $t_{1/2}$, амидных протонов остатков APPjmtm на дейтерий растворителя. Закрашенными кругами показаны остатки с $t_{1/2} > 2$ ч, пустыми – с $1 \leq t_{1/2} \leq 2$ ч; для остальных остатков $t_{1/2} < 1$ ч. *Снизу* квадратами обозначены остатки APPjmtm, сигналы амидных протонов которых претерпевают изменения химического сдвига более 3×10^{-3} м.д. при изменении температуры на 1°C , что указывает на доступность данных протонов растворителю. *в* – Приведено отличие значений химических сдвигов сигналов ядер $^{13}\text{C}\alpha$ и $^1\text{H}^{\text{N}}$ APPjmtm от табличного значения в конформации «неупорядоченный клубок», так называемый вторичный химический сдвиг. Значение $\Delta\delta_{^{13}\text{C}\alpha}$ (показано *сверху*) зависит от типа вторичной структуры полипептидной цепи: положительное для спиральных участков, отрицательное для развернутой (в том числе β -структуры) конформации [18]. Значение $\Delta\delta_{^1\text{H}^{\text{N}}}$ (показаны *снизу*) помимо прочего сильно зависит от длины водородной связи, в которой участвует амидный протон, при этом локальное увеличение значения $\Delta\delta_{^1\text{H}^{\text{N}}}$ указывает на укорочение данной водородной связи [24]. *г* – Для амидных групп APPjmtm приведены ^{15}N -релаксационные параметры: *сверху*, значения гетероядерного $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ ЯЭО; *снизу*, значения эффективного времени корреляции броуновского вращения τ_R , рассчитанного из отношения $^{15}\text{N} T_1/T_2$. *д* – Уширение сигналов амидных групп APPjmtm в спектрах $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC после добавления 5- и 16-ДСК (в соотношении одна спиновая метка на мицеллу), имеющих тенденцию преимущественно распределяться вблизи поверхности и центра мицеллы соответственно. *е* – Изменение обобщенного химического сдвига $\Delta\delta_{[^1\text{H}^{\text{N}]}}$ кросс-пиков от амидных групп APPjmtm в спектрах $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC при добавлении одной молекулы холестерилгемисукцината на мицеллу ДФХ. *ж* – Распределение значений углов φ , ψ и χ^1 основной и боковой цепей остатков по репрезентативному набору из 20 ЯМР-структур APPjmtm. Под аминокислотной последовательностью APPjmtm стрелками указаны места расщепления APP α - и γ -секретазы, а также аминокислотные мутации, обнаруженные при наследственных формах болезни Альцгеймера [8, 10].



мационного обмена и содержание белковых примесей не более 5%. Для последовательного отнесения ^1H -, ^{13}C - и ^{15}N -резонансов APPjmtm и получения структурно-динамической информации был накоплен стандартный набор из двух- и трехмерных гетероядерных ЯМР-спектров (см. раздел «Экспериментальная часть»).

Из анализа совокупности полученных ЯМР-данных следует, что пептид APPjmtm содержит два структурированных спиральных участка. Здесь наблюдаются характерные для спиралей i -, $i+3$ -контакты ЯЭО (рис. 2а) и положительные вторичные химические сдвиги сигналов $^{13}\text{C}\alpha$ (рис. 2в), а также небольшие значения температурных коэффициентов химических сдвигов сигналов $^1\text{H}^{\text{N}}$ (рис. 2б). В спектрах $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC и $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC кросс-пики ЯЭО между протонами аминокислотных остатков двух спиральных участков не обнаружены, что, по-видимому, свидетельствует об отсутствии межспиральных взаимодействий. В результате расчета пространственной структуры на основе экспериментальных данных, приведенных в таблице, установлено, что APPjmtm в мицеллахДФХ состоит из двух α -спиралей – Lys687–Asp694 и Gly700–Leu723 (рис. 3), соединенных неструктурированным петлевым участком Val695–Lys699. Относительная ориентация двух спиралей в полученном наборе структур APPjmtm не определена (рис. 3а). В то же время структура каждой α -спирали рассчитана с высокой точностью (таблица, рис. 2ж, 3а,б). Отметим также, что конформация основной цепи и боковых цепей точнее установлена для α -спирали Gly700–Leu723.

Для определения топологии α -спиралей APPjmtm в мицеллеДФХ проанализировано уширение сигналов протонов амидных групп пептида, вызванное их пространственной близостью к парамагнитным спиновым меткам 5- и 16-ДСК, преимущественно распределяющимся вблизи поверхности и центра мицеллы соответственно. На основании картины изменения интенсивности кросс-пиков в спектре $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC при добавлении спиновых меток (рис. 2д), а также данных о замедленном обмене протонов амидных групп на дейтерий растворителя (рис. 2б) сделан вывод о том, что α -спираль Lys687–Asp694 (далее JM-спираль) лежит в области гидратированных полярных группДФХ, а α -спираль Gly700–Leu723 (далее TM-спираль) пронизывает гидрофобную часть мицеллы. Амфифильность короткой JM-спирали также предполагает ее расположение вдоль поверхности мицеллы приблизительно перпендикулярно к TM-спирали, как показано на рис. 3г. Следующие друг за другом слабополярные и гидрофобные аминокислотные остатки на участке Gly700–Leu723 форми-

Структурная статистика для репрезентативного набора из 20 ЯМР-структур APPjmtm, встроенного в мицеллыДФХ

| ЯМР-данные для расчета структуры | Статистика |
|---|-----------------|
| Общее количество ограничений ЯЭО | 318 |
| Внутриостаточные | 111 |
| Межостаточные | 207 |
| последовательные ($ i-j =1$) | 132 |
| средней дальности ($1 < i-j \leq 4$) | 75 |
| дальние ($ i-j > 4$) | 0 |
| Ограничения на водородные связи (верхние/нижние) между атомами основной цепи (24 связи) между атомами основной и боковой цепей (0 связей) | 72/72 0/0 |
| Ограничения на двугранные углы | 74 |
| угол ϕ основной цепи | 30 |
| угол ψ основной цепи | 30 |
| угол χ^1 боковой цепи | 14 |
| Качество расчета и структурная статистика | |
| Штрафная функция программы CYANA (Å^2) | 0.38 ± 0.03 |
| Нарушения ограничений | |
| на расстояния ($>0.2 \text{ Å}$) | 1 |
| на двугранные углы ($>5^\circ$) | 0 |
| Попарное среднеквадратическое отклонение между структурами (Å) | |
| примембранная α -спираль, остатки Lys687–Asp694 | |
| по атомам основной цепи | 0.23 ± 0.09 |
| по всем тяжелым атомам | 1.59 ± 0.28 |
| TM α -спираль, остатки Gly700–Leu723 | |
| по атомам основной цепи | 0.14 ± 0.05 |
| по всем тяжелым атомам | 0.55 ± 0.10 |
| Анализ карты Рамачандрана (% остатков) | |
| в благоприятных регионах | 84.6 |
| в дополнительных разрешенных регионах | 13.5* |
| в принципиально разрешенных регионах | 1.5* |
| в запрещенных регионах | 0.4* |

*Остатки из подвижных и неструктурированных участков APPjmtm.

руют протяженный $\sim 40 \text{ Å}$ TM-сегмент. Положительно заряженные аминокислотные группы боковых цепей Lys699 и Lys724, фланкирующих TM-спираль, взаимодействуют, по-видимому, с отрицательно заряженными фосфатными группами головок детергента. Наблюдаемая $i+4$ -периодичность вторичного химического сдвига сигналов протонов $^1\text{H}^{\text{N}}$ (рис. 2в) указывает на периодическое изменение длин водородных связей $\text{H}^{\text{N}} \cdots \text{O}^{\text{C}}$ вдоль TM-спирали [24]. Амидные группы остатков Leu705, Gly709, Ala713 и Val715, располо-

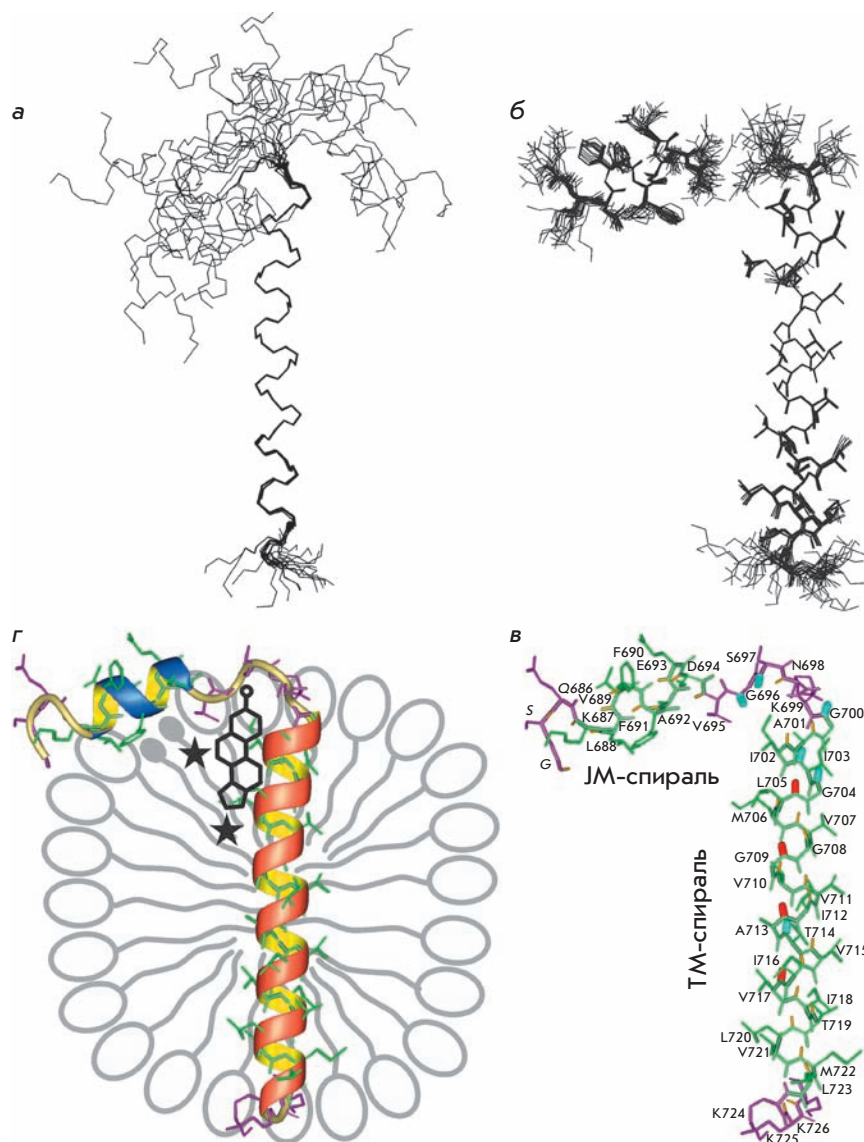


Рис. 3. Пространственная структура APPjmtm. **а** – Набор из 20 ЯМР-структур APPjmtm, совмещенных по атомам основной цепи α -спирали Gly700–Leu723. Показана только основная цепь пептида. **б** – Набор из 20 ЯМР-структур APPjmtm, совмещенных по атомам основных цепей α -спиралей Lys687–Asp694 (JM-спираль) и Gly700–Leu723 (TM-спираль) по отдельности. Из-за неопределенности в расположении α -спиралей относительно друг друга структуры APPjmtm приведены с разрывом в неструктурированном петлевом участке между остатками Gly696–Ser697. Показаны только тяжелые атомы. **в** – Репрезентативная пространственная структура APPjmtm с нумерацией остатков, соответствующей APP. Показаны ковалентные связи с участием тяжелых атомов (для α -спиралей зеленым цветом), а также амидных протонов (желтым). Красным выделены амидные группы остатков TM-спирали с максимальными локальными значениями вторичного химического сдвига $\Delta\delta_{\text{HN}} \approx 0$ (рис. 2в). Голубым выделены амидные группы остатков, показавшие изменение обобщенного химического сдвига $\Delta\delta_{\text{[HN]}} > 0.04$ (рис. 2е) при добавлении аналога холестерина к мицеллам со встроенным APPjmtm. **г** – Представлено схематичное изображение мицеллыДФХ со встроенным мономером APPjmtm, JM- и TM-спирали которого выделены синим и красным соответственно. Под JM-спиралью показано предполагаемое разрежение полярных головок детергента со встроенными спиновыми метками 5- и 16-ДСК, парамагнитные центры которых схематично показаны в виде звездочек, расположенных ближе к поверхности и к центру мицеллы соответственно. Под межспиральной петлей рядом с N-концом TM-спирали схематично указан холестеринсвязывающий центр TM-домена APP.

женные на одной стороне TM-спирали (рис. 3в), образуют более короткие водородные связи $\text{H}^{\text{N}} \cdots \text{O}^{\text{C}}$, чем остатки с противоположной стороны спирали. Таким образом, у TM-спирали в районе спаренных остатков Gly708–Gly709 имеется небольшая вогнутость со слабополярной поверхностью.

Наличие двух независимых спиральных участков в структуре APPjmtm подтверждается также ^{15}N -релаксационными данными. JM- и TM-спирали APPjmtm имеют разные характерные значения (~ 6

и ~ 9 нс соответственно) эффективного времени корреляции броуновского вращения τ_{R} , рассчитанного из отношения T_1/T_2 (рис. 2г). Оценка массы супрамолекулярного комплекса согласно эмпирической зависимости [25] из усредненного по спиральным участкам значения $\langle \tau_{\text{R}} \rangle \approx 8$ нс дает величину около 27 кДа, что соответствует мономеру APPjmtm, окруженному примерно 57 молекулами детергента (типичный состав мицеллыДФХ [26]). Значительная разница (~ 3 нс) в значениях $\langle \tau_{\text{R}} \rangle$ у остатков

JM- и ТМ-спиралей частично объясняется топологией APPjmtm с перпендикулярным относительным расположением α -спиралей в анизотропно вращающейся мицелле. Помимо этого, возможно вращение APPjmtm внутри мицеллы, а также повышенная латеральная подвижность JM-спирали (по сравнению с ТМ-сегментом) за счет подвижной соединительной петли Val695–Lys699. О подвижности петлевого участка в сравнении с α -спиралью свидетельствует локальное уменьшение для Ser697 значения эффективного времени корреляции броуновского вращения τ_r . В свою очередь, из распределения значений гетероядерного $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ ЯЭО (рис. 2г) следует, что, в отличие от жесткой ТМ-спирали ($^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ ЯЭО ≥ 0.8), N-концевая половина JM-спирали и соединительная петля Val695–Lys699 подвижны в пиконаносекундном диапазоне ($0.6 \leq ^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ ЯЭО ≤ 0.8). Повышенная подвижность приводит к тому, что конформация JM-спирали установлена менее точно (таблица, рис. 2ж и 3б), а структура петлевого участка не определена.

Полученные в настоящей работе структурно-динамические данные соответствуют результатам недавних ЯМР-исследований [13] вторичной структуры и динамики более длинного фрагмента APP – Asp672–Asn770, так называемого пептида С99, который является С-концевой частью APP после гидролиза β -секретазой. Определены границы спиральных участков Val689–Asp694 и Asn698–Lys724, пептида С99, соответствующих α -спиральям – короткой примембранной и длинной трансмембранной, соединенным подвижной перемычкой. Однако пространственная структура пептида С99 не была рассчитана. На основании данных о титровании пептида С99 в мицеллах LMPG водорастворимым аналогом холестерина, β -CHOLVIMALT, предположили, что APP может функционировать и как сенсор холестерина в мембране нейронов. Действительно известно, что в организме человека APP накапливается в богатых холестерином микродоменах, названных липидными рафтами [27, 28]. Более того, ферментативный гидролиз β -секретазой, ведущий к образованию β -амилоида, происходит, в первую очередь, в липидных рафтах [28]. Также установлено, что гидролиз по неамилоидогенному пути α -секретазой происходит вне холестерин-богатых кластеров, причем фермент инактивируется при связывании субстрата с липидными рафтами [28]. В настоящей работе изучено связывание APPjmtm со встраивающимся в мицеллу аналогом холестерина – холестерилгемисукцинатом. Наиболее значимые изменения обобщенного химического сдвига $\Delta\delta_{\text{[HN]}}$ наблюдаемые у остатков Gly695, Ser696, Gly700, Ile701, Ile703 и Thr713 (рис. 2е), указывают на место встраивания

холестерилгемисукцината в области межспиральной петли (рис. 3в,г), что хорошо согласуется с ранее полученными данными о специфическом взаимодействии пептида С99 с другим аналогом холестерина [13].

Данные по титрованию APPjmtm в мицеллах парамагнитными спиновыми метками (рис. 2д) косвенно подтверждают, что рядом с JM-спиралью и N-концом ТМ-спирали находится гидрофобная полость, предназначенная для взаимодействия APP с холестерином. При равномерном распределении спиновых меток 5- или 16-ДСК наблюдалось бы одинаковое уширение сигналов, находящихся на одном расстоянии от центра мицеллыДФХ. Однако в обоих случаях регистрируется различное уширение сигналов остатков, находящихся на разных концах трансмембранной α -спирали (рис. 2д). Причин у этого явления может быть несколько. Во-первых, распределение спиновых меток по мицелле может быть неоднородным в силу особой структуры и свойств встроенного в нее APPjmtm. Во-вторых, длина и размер боковых цепей, контактирующих с метками аминокислотных остатков, влияют на степень экранирования амидных протонов (что, видимо, наиболее выражено на участках Gly700–Leu705 и Ile718–Leu723). Вместе с тем значительное уширение сигналов на участке Leu688–Ala692 при титровании спиновой меткой 16-ДСК напрямую указывает на локальное изменение структуры мицеллы под поверхностной примембранной α -спиралью, которая, по-видимому, «расталкивает» полярные головкиДФХ (липидов), что приводит к образованию «гидрофобного кармана». В этот «карман» с некоторой избирательностью встраиваются обе спиновые метки (рис. 3г), имеющие небольшие полярные группы.

Модификация внешних условий и окружения APP в клеточной мембране может влиять на изменение конформации межспирального петлевого участка. Это должно привести к вариации взаимной ориентации JM- и ТМ-спиралей с изменением размера холестеринсвязывающего «гидрофобного кармана», что, в свою очередь, может играть роль в модулировании функции APP. Тандем из остатков Gly708–Gly709 в центре ТМ-спирали APP может служить неким компенсатором толщины липидного бислоя, которая изменяется в зависимости от состава клеточной мембраны, в том числе из-за холестерина, входящего в состав липидных рафтов. Важно отметить, что семейные мутации, ассоциированные с ранним развитием болезни Альцгеймера, сосредоточены не только рядом с ТМ-сайтами расщепления APP γ -секретазой, но и на С-конце JM-спирали, где расположены ионогенные остатки Asp693 и Glu694 (рис. 2, низ). Поэтому установлен-

ние в мембраноподобной среде методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии пространственной структуры ТМ-домена APP с холестеринсвязывающим примембранным участком является необходимым шагом в раскрытии молекулярного механизма альтернативного расщепления APP, ассоциированного с патогенезом болезни Альцгеймера. ●

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, Федеральной целевой программой «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» и Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grigorenko A.P., Rogaev E.I. // Mol. Biol. (Mosk). 2007. V. 41. P. 331–345.
2. Duce J.A., Tsatsanis A., Cater M.A., James S.A., Robb E., Wikke K., Leong S.L., Perez K., Johanssen T., Greenough M.A., et al. // Cell. 2010. V. 142. P. 857–867.
3. Rauk A. // Dalton Trans. 2008. V. 14. P. 1273–1282.
4. Selkoe D.J. // Nature. 2003. V. 426. P. 900–904.
5. Steiner H., Fluhrer R., Haass C. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 29627–29631.
6. Soscia S.J., Kirby J.E., Washicosky K.J., Tucker S.M., Ingelsson M., Hyman B., Burton M.A., Goldstein L.E., Duong S., Tanzi R.E., Moir R.D. // PLoS One. 2010. V. 5. P. e9505.
7. Thinakaran G., Koo E.H. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 29615–29619.
8. Wiley J.C., Hudson M., Kanning K.C., Schecterson L.C., Bothwell M. // J. Neurochem. 2005. V. 94. P. 1189–1201.
9. Gorman P.M., Kim S., Guo M., Melnyk R.A., McLaurin J., Fraser P.E., Bowie J.U., Chakrabartty A. // BMC Neuroscience. 2008. V. 9. P. 17–27.
10. Munter L.M., Voigt P., Harmeier A., Kaden D., Gottschalk K.E., Weise C., Pipkorn R., Schaefer M., Langosch D., Multhaup G. // EMBO J. 2007. V. 26. P. 1702–1712.
11. Kienlen-Campard P., Tasiaux B., van Hees J., Li M., Huysseune S., Sato T., Fei J.Z., Aimoto S., Courttoy P.J., Smith S.O., et al. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 7733–7744.
12. Marenchino M., Williamson P.T., Murri S., Zandomenighi G., Wunderli-Allenspach H., Meier B.H., Krämer S.D. // Biophys. J. 2008. V. 95. P. 1460–1473.
13. Beel A.J., Mobley C.K., Kim H.J., Tian F., Hadziselimovic A., Jap B., Prestegard J.H., Sanders C.R. // Biochemistry. 2008. V. 47. P. 9428–9446.
14. Curtain C.C., Ali F., Volitakis I., Cherny R.A., Norton R.S., Beyreuther K., Barrow C.J., Masters C.L., Bush A.I., Barnham K.J. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 20466–20473.
15. Bokvist M., Lindstrom F., Watts A., Grubner G. // J. Mol. Biol. 2004. V. 335. P. 1039–1049.
16. Бочарова О.В., Надеждин К.Д., Бочаров Э.В., Арсеньев А.С. // Биоорган. химия. 2010. Т. 36. № 1. С. 105–111.
17. Keller R.L.J. The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial, Goldau, Switzerland: CANTINA Verlag, 2004. 81 p.
18. Cavanagh J., Fairbrother W.J., Palmer A.G., Skelton N.J. Protein NMR spectroscopy: principles and practice. 2nd ed. San Diego, CA, USA: Acad. Press, 2007. 886 p.
19. Bocharov E.V., Korzhnev D.M., Blommers M.J., Arvinte T., Orekhov V.Y., Billeter M., Arseniev A.S. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 46273–46279.
20. Güntert P. // Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 2003. V. 43. P. 105–125.
21. Cornilescu G., Delaglio F., Bax A. // J. Biomol. NMR. 1999. V. 13. P. 289–302.
22. Baker E.N., Hubbard R.E. // Prog. Biophys. Molec. Biol. 1984. V. 44. P. 97–179.
23. Koradi R., Billeter M., Wüthrich K.J. // Mol. Graphics. 1996. V. 14. P. 51–55.
24. Wagner G., Pardi A., Wüthrich K. // J. Am. Chem. Soc. 1983. V. 105. P. 5948–5949.
25. Daragan V.A., Mayo K.H. // Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 1997. V. 31. P. 63–105.
26. Lazaridis T., Mallik B., Chen Y. // J. Phys. Chem. B. 2005. V. 109. P. 15098–15106.
27. Vetrivel K.S., Thinakaran G. // Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 1801. P. 860–867.
28. Beel A.J., Sakakura M., Barrett P.J., Sanders C.R. // Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 1801. P. 975–982.