

УДК 541.12.038.2:536.75:536.728

**ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ ГЕПТАПЕПТИДА $A\beta_{16-22}$
В РАСТВОРЕ И КОМПЛЕКСЕ ГЕПТАПЕПТИД –
МОДЕЛЬ БИОЛОГИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ**

*К.С. Усачев, А.Р. Юльметов, А.В. Филиппов, О.Н. Анцуткин,
С. Афонин, А.В. Аганов, В.В. Клочков*

Аннотация

Методами ЯМР ^1H спектроскопии и двумерной ЯМР (TOCSY, HSQC-HECADE, NOESY) спектроскопии исследовано и описано пространственное строение активного фрагмента бета-амилоида $A\beta_{1-40}$ – гептапептида $A\beta_{16-22}$ (Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu) – в растворе и комплекса гептапептид – модель поверхности мембраны клетки (мицеллы, на основе додецилсульфата натрия). Комплексообразование подтверждено изменением химических сдвигов ЯМР ^1H спектров гептапептида, а также знаками и величинами ядерного эффекта Оверхаузера в различных средах. Проведено сравнение пространственного строения гептапептида, определенного в растворе боратного буфера и в комплексе Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu – модель поверхности мембраны клетки.

Ключевые слова: структура, бета-амилоид, мицеллы, ЯМР ^1H спектроскопия, двумерная ЯМР (TOCSY, HSQC-HECADE, NOESY) спектроскопия.

Введение

Болезнь Альцгеймера (также сенильная деменция альцгеймеровского типа) – неизлечимое нейродегенеративное заболевание, характеризующееся накоплением β -амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков в тканях головного мозга. Бляшки состоят из фибрилл, образованных в результате агрегации малых пептидов длиной в 39–43 аминокислотных остатков, именуемых амилоидными $A\beta$ -пептидами. Эти пептиды являются продуктом энзиматического расщепления более крупного белка-предшественника – APP (amyloid precursor protein) [1]. Этот трансмембранный белок играет важную роль в росте нейрона, его выживании и восстановлении после повреждений. В свою очередь, $A\beta$ -пептиды, как известно [1, 2], участвуют в механизмах иммунной защиты.

Для создания лекарственных препаратов, препятствующих развитию сенильной деменции, необходимо иметь точную информацию о механизме агрегации альцгеймеровских β -амилоидов. Предполагается, что ядром агрегации является активный участок этого пептида между 16-м и 22-м аминокислотными остатками [2]. По этой причине пространственное строение фрагмента $A\beta_{16-22}$ (Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu) представляет интерес. Нейротоксичное действие альцгеймеровских амилоидных пептидов проявляется в результате их взаимодействия с клеточной мембраной [3]. Отсюда описание пространственного строения комплекса β -амилоид – мембрана, так же как и строения β -амилоида в растворе, позволит подойти к фундаментальному пониманию механизмов, протекающих

на поверхности клеток, что может дать возможность поиска лекарственных препаратов, ингибирующих образование сенильных бляшек.

Экспериментальная часть

Синтез исследуемого пептида $A\beta_{16-22}$ выполняли методом твердофазного синтеза [4, 5] с помощью автоматического синтезатора пептидов ABI 433A (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) [6] при использовании аминокислот, защищенных 9-флуоренилметокси-карбонильными группами, при этом осуществлялся контроль процесса по проводимости реакционной смеси. Отделение пептида от подложки и защитных групп производили в кислой среде на основе трифторуксусой кислоты. Очистку пептида производили методом высокопроизводительной жидкостной хроматографии на приборе Series 200 Perkin Elmer HPLC System (Waltham, MA, USA) в градиенте вода – ацетонитрил. Качество конечного продукта характеризовали методом MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption-ionization) масс-спектрометрии. Пептид до использования хранился при температуре 75 °C.

Регистрацию 1D и 2D (1H – 1H , 1H – ^{13}C) спектров ЯМР гептапептида $A\beta_{16-22}$ в растворах боратного буфера ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O + D_2O$) и в смеси *n*-алкил-поли-(этилен)гликоля ($C_{12}E_5$), нормального спирта (гексанол) и исходного боратного буфера проводили на ЯМР-спектрометре AVANCE II-500 (Bruker) (500 МГц (1H), 125.76 МГц (^{13}C)) при температуре 293 К. Спектрометр работает в режиме внутренней стабилизации по линии резонанса 2H . При записи спектров ЯМР 1H использовали 90°-импульсы и задержки между импульсами равнялись 2 с; ширина спектра была 9.40 м.д.; число накоплений от 10. Для отнесения сигналов в спектрах ЯМР 1H гептапептида $A\beta_{16-22}$ использовали двумерную 2D TOCSY спектроскопию. Образцы представляли собой растворы соединения в соответствующих средах, концентрации веществ 0.5% (весовых) при записи ЯМР 1H . Отсчет химических сдвигов производили от линий резонанса эталонных жидкостей.

При проведении двумерных ЯМР-экспериментов (NOESY-модификация) в молекулярной системе время задержки между последовательностями импульсов было в 3 раза больше, чем усредненное время продольной релаксации T_1 для протонов гептапептида $A\beta_{16-22}$. Спектры записывали с использованием фазочувствительной методики для 1024 точек F2-координаты и 256 точек F1-координаты; использовали экспоненциальную фильтрацию вдоль обеих координат. Параметр времени смешивания τ_m выбирали равным 0.10, 0.30, 0.40, 0.60 и 0.80 с.

ЯМР-спектроскопия гептапептида $A\beta_{16-22}$ в растворе

Гептапептид $A\beta_{16-22}$ (рис. 1) является активным фрагментом β -амилоида $A\beta_{1-40}$. Предполагается, что данный фрагмент отвечает за агрегацию между β -амилоидами. Слабая растворимость пептида $A\beta_{16-22}$ в воде обусловила задачу поиска соответствующих водосодержащих смесей. В конечном итоге был выбран боратный буфер с pH 8.4. Отметим, что в этой среде длительное время не наблюдалась агрегация исследуемого пептида.

ЯМР 1H спектр гептапептида $A\beta_{16-22}$ в растворе боратного буфера представлен на рис. 2 (химические сдвиги приведены в табл. 1).

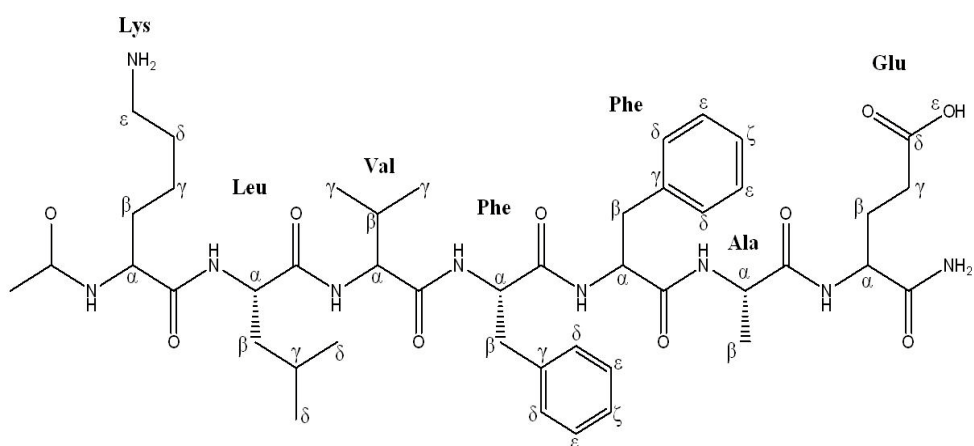
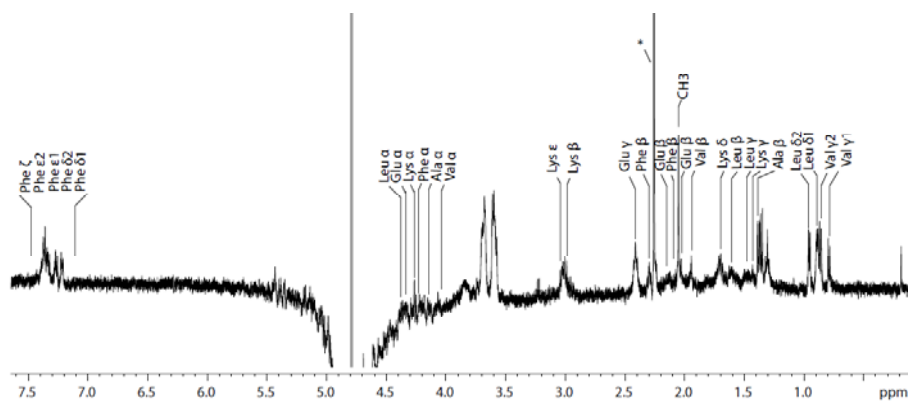
Рис. 1. Структурная формула гептапептида A β ₁₆₋₂₂ (NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH₂)Рис. 2. ¹H (500 МГц) спектр ЯМР гептапептида A β ₁₆₋₂₂ в растворе боратного буфера (Na₂B₄O₇·10H₂O + D₂O) при pH 8.4; T 293 K; 0 м.д. соответствует сигналу ЯМР ¹H TMS

Табл. 1

ЯМР ¹H химические сдвиги (δ_H , м.д., относительно TMS) гептапептида A β ₁₆₋₂₂ в растворе боратного буфера (Na₂B₄O₇·10H₂O + D₂O) при pH 8.4; T 293 K

Остаток	Химические сдвиги			
	C _α H	C _β H	C _γ H	Прочие
NAc	2.05			
Lys16	4.26	3.00	1.38	1.7 (δ), 2.95 (ε)
Leu17	4.36	1.60	1.49	0.86 (δ ₁), 0.93 (δ ₂)
Val18	4.06	1.94	0.78, 0.84	
Phe19	4.20	2.07, 2.28		
Phe20	4.20	2.07, 2.28		
Ala21	4.13	1.34		
Glu22	4.35	2.38, 2.11	2.41	

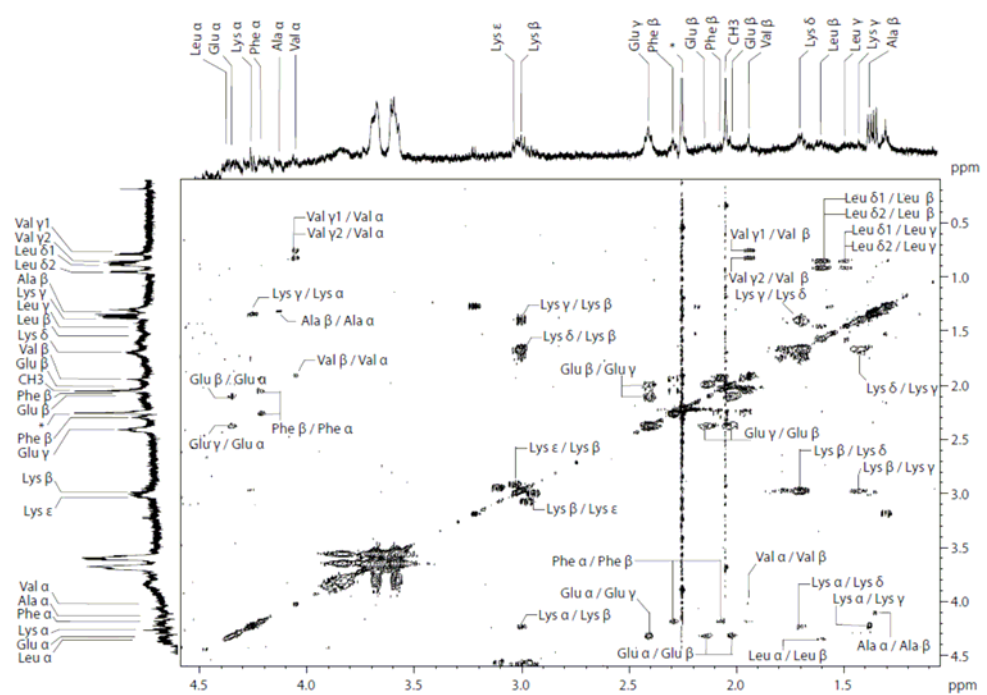


Рис. 3. Двумерный ^1H – ^1H TOCSY спектр ЯМР гептапептида $\text{A}\beta_{16-22} \text{NH}_2$ в растворе боратного буфера ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$) при pH 7.4; T 293 К

Табл. 2

ЯМР ^{13}C химические сдвиги гептапептида $\text{A}\beta_{16-22}$ в растворе боратного буфера ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$) при pH 7.4; T 293 К

Остаток	Химические сдвиги			
	C_αH	C_βH	C_γH	Прочие
NAc	21.5			
Lys16	53.18		16.2	26.4 (δ), 39.4 (ϵ)
Leu17				20.7 (δ_1), 22.0 (δ_2)
Val18	53.6		18.27 (γ_1), 17.57 (γ_2)	
Phe19		33.4		
Phe20		33.4		
Ala21		16.5		
Glu22			31.0	

С учетом данных о наличии кросс-пиков в двумерных ^1H – ^1H TOCSY (рис. 3) и ^1H – ^1H COSY спектрах и сведений из литературы о химических сдвигах протонов в аминокислотных фрагментах [7, 8], были отнесены сигналы протонов CH -, CH_2 - и CH_3 -групп аминокислот исследуемого гептапептида.

Величины химических сдвигов ЯМР ^{13}C были получены на основе анализа двумерного ^1H – ^{13}C HSQC спектра ЯМР (рис. 4) гептапептида $\text{A}\beta_{16-22}$ в растворе боратного буфера (химические сдвиги приведены в табл. 2).

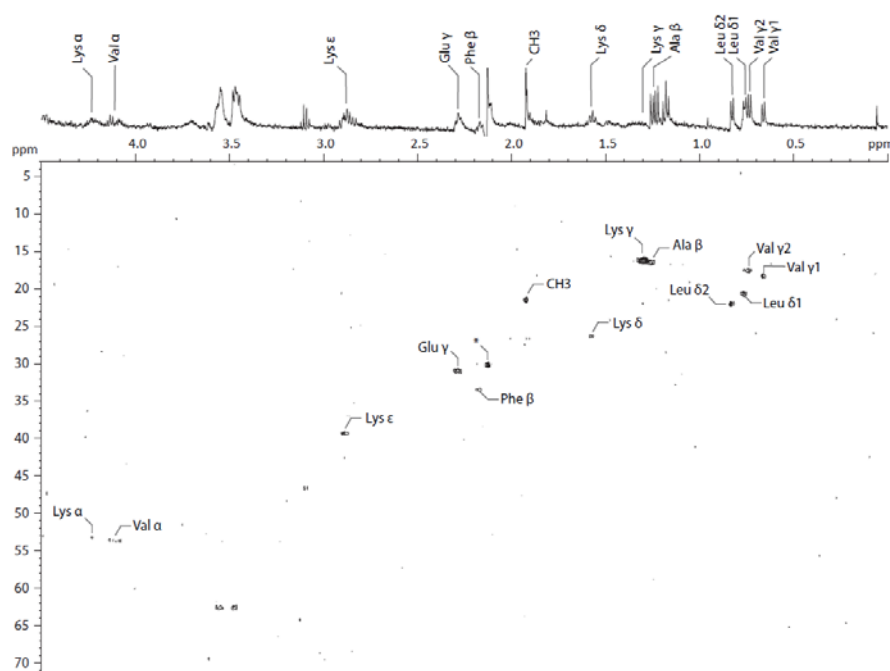


Рис. 4. Двумерный ^1H – ^{13}C HSQC спектр ЯМР гептапептида A β ₁₆₋₂₂ в растворе боратного буфера ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$) при pH 7.4; T 293 K

Пространственное строение гептапептида A β ₁₆₋₂₂, определенное анализом остаточного диполь-дипольного взаимодействия

Для определения пространственной структуры небольших молекул (например, олигопептидов) двумерная ЯМР NOESY спектроскопия не всегда эффективна. Это связано с малыми временами корреляции движения таких молекул в растворе, что приводит к слабым по интенсивностям кросс-пикам в двумерных спектрах ЯМР NOESY. Известно, что в растворах диполь-дипольное взаимодействие между магнитными ядрами полностью усредняется. Если растворить молекулярную систему в лиотропной жидкокристаллической системе, то из-за соударений о магнитно-ориентированные молекулярные образования, движение молекул перестает быть изотропным. Эта анизотропия в движении молекул приводит к появлению диполь-дипольного взаимодействия между магнитными ядрами ^1H и ^{13}C ($^1\text{D}_{\text{CH}}$), что проявляется в ЯМР-спектрах в виде остаточного диполь-дипольного взаимодействия. Значение константы зависит от угла между направлениями магнитного поля и ^1H – ^{13}C -связи. С помощью расчетов можно связать значения наблюдаемых констант с пространственным расположением межъядерных векторов и получить структуру соединения в растворе.

Экспериментальные данные величин взаимодействия получены с помощью двумерного ^1H – ^{13}C HSQC-HECADE-эксперимента [9].

Спектр HSQC-HECADE эксперимента для гептапептида A β ₁₆₋₂₂, растворенного в боратном буфере, приведен на рис. 5. Из данного эксперимента были получены значения прямых констант спин-спинового взаимодействия (КССВ) между ядрами ^1H и ^{13}C в герцах.

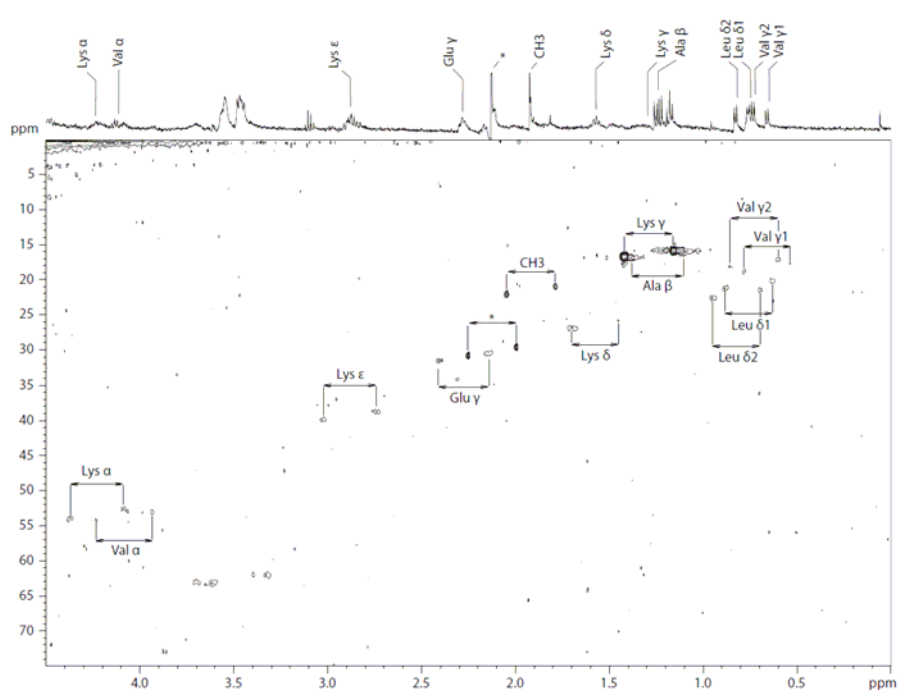


Рис. 5. Двумерный ^1H - ^{13}C HSQC-HECADE спектр ЯМР гептапептида $\text{A}\beta_{16-22}$ в растворе боратного буфера ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$) при pH 7.4; T 293 K

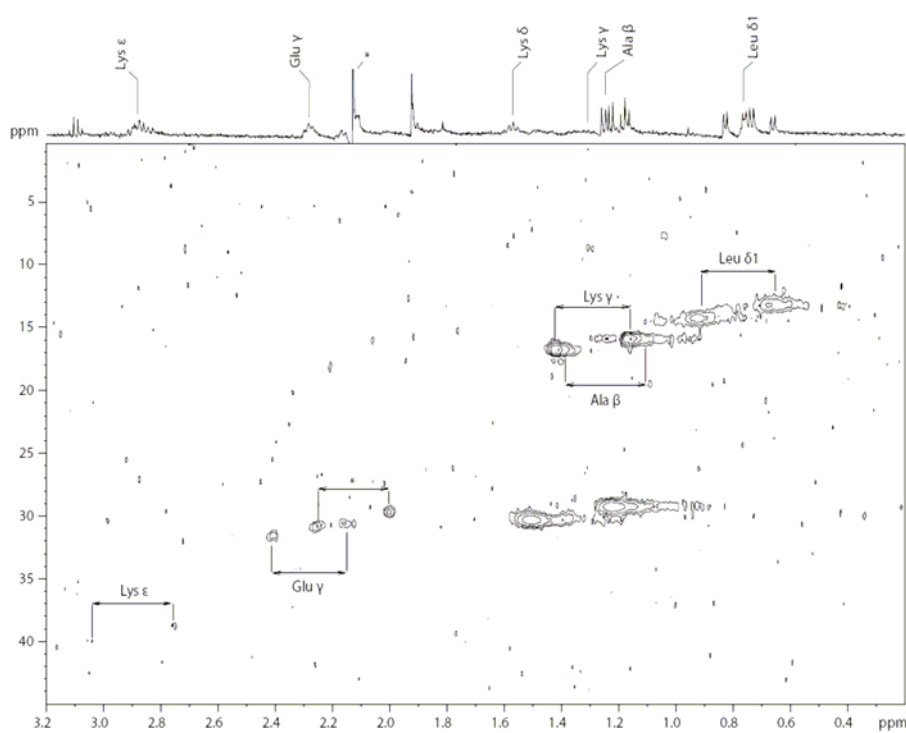


Рис. 6. Двумерный ^1H - ^{13}C HSQC-HECADE спектр ЯМР гептапептида $\text{A}\beta_{16-22}$ в смеси n -алкил-поли(этилен)гликоля (C_{12}E_5), нормального спирта (гексанола) и исходного боратного буфера ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$); T 293 K

Табл. 3

Экспериментальные величины остаточного диполь-дипольного взаимодействия гептапептида Аβ₁₆₋₂₂, Гц

Остаток	¹ D _{CH}			
	C _α H	C _β H	C _γ H	Прочие
Lys16	-16.2		3	-5.9 (ε)
Leu17				-2.4 (δ ₁)
Ala21		-2.5		
Glu22			6.1	

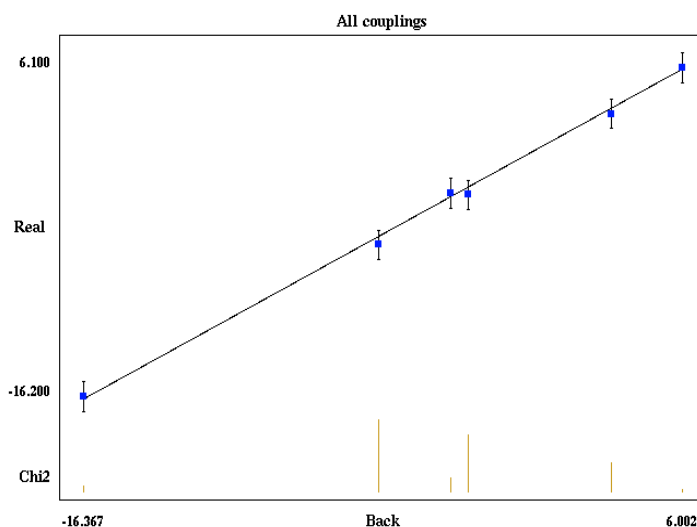


Рис. 7. Соотношение между наблюдаемыми величинами ¹D_{CH} для гептапептида Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu, растворенного в лиотропной жидкокристаллической среде, и рассчитанными величинами ¹D_{CH} в конформации, определенной с помощью программы DYNAMO

Затем гептапептид был растворен в жидкокристаллической лиотропной системе, представляющей собой смесь *n*-алкил-поли(этилен)гликоля (C₁₂E₅), нормального спирта (гексанол) и исходного боратного буфера [10], и с помощью двумерного ¹H-¹³C HSQC-HECADE-эксперимента были получены прямые константы спин-спинового взаимодействия в данной среде (¹J_{CH} + ¹D_{CH}). Спектр двумерного ¹H-¹³C HSQC-HECADE-эксперимента для гептапептида растворенного в лиотропной среде приведен на рис. 6.

Величины остаточного диполь-дипольного взаимодействия (¹D_{CH}) (табл. 3) были получены вычитанием из значений прямых констант спин-спинового взаимодействия, определенных в жидкокристаллической лиотропной среде (¹J_{CH} + ¹D_{CH}), величин КССВ в исходном боратном буфере (¹J_{CH}). Анализ полученных величин остаточного диполь-дипольного взаимодействия (¹D_{CH}) осуществлялся с помощью метода молекулярной механики в программе DYNAMO [11].

Данная программа позволяет связывать значения наблюдаемых констант и пространственное расположение межъядерных векторов относительно внешнего магнитного поля в рамках известной конформации исследуемой молекулы. Критерием соответствия между рассчитанной и реальной структурами является

линейная корреляция между наблюдаемыми и рассчитанными значениями остаточных величин диполь-дипольного взаимодействия. Оптимизация исходной конформации гептапептида путем поворота отдельных фрагментов молекулы относительно друг друга позволила выбрать единственную пространственную структуру, для которой наблюдалась линейная корреляция между наблюдаемыми и рассчитанными величинами $^1D_{CH}$ (рис. 7).

Рассчитанная структура гептапептида $A\beta_{16-22}$ (NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH₂) в растворе, для которой наблюдалось лучшее соответствие между наблюдаемыми и рассчитанными величинами диполь-дипольного взаимодействия, приведена на рис. 12, а.

**Пространственное строение гептапептида $A\beta_{16-22}$ в комплексе:
олигопептид – синтетическая модель поверхности мембраны клетки
на основе додецил сульфата натрия**

Протеины могут взаимодействовать с мембраной клетки преимущественно двумя способами: проникновением сквозь бислой (и тогда говорят об интегральных мембранных белках) или образованием комплекса с поверхностью бислоя (периферийные или внешние мембранные белки) [1]. В настоящее время ЯМР-спектроскопия широко используется для исследования структуры липидной мембраны, однако ее приложения к исследованию комплексов протеин – мембрана клетки все еще ограничены.

В качестве примеров первых исследований методом ЯМР-спектроскопии комплексов протеин – мембрана можно привести исследования амфифильных пептидов, таких как мелиттин (melittin), пептид из пчелиного яда (26 аминокислотных остатков), и пептид δ -гемолизин (δ -hemolysin), небольшой пептид, выделенный из *Staphylococcus aureus*, которые имеют тенденцию агрегировать в водном растворе [12–14].

Известно, хорошей моделью мембранной поверхности и подходящей для структурных исследований методом ЯМР-спектроскопии [13, 15] являются мицеллы и мицеллярные комплексы. Одной из наиболее полных работ, выполненных в этом направлении, является работа [16], в которой методами спектроскопии ЯМР (TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY) изучается структура комплекса протеин (Gly-Leu-Phe-Asp-Lys-Leu-Lys-Ser-Leu-Val-Ser-Asp-Asp-Lys-Lys) – мицеллы.

Для исследования комплексов протеин – поверхность мембраны доступно два варианта синтетической модели поверхности мембраны клетки: мицеллы на основе поверхностно-активных веществ и небольшие фосфолипидные везикулы [12, 16]. Среда, которая наиболее близко соответствует нативному бислою липида, состоит из фосфолипидных везикул, минимальный размер частиц которых составляет 250–300 Å в диаметре. Частицы такого размера имеют большое вращательное время корреляции ($\tau_c \sim 4 \cdot 10^{-6}$ с). Длинные времена корреляции приводят к коротким значениям времен поперечной релаксации T_2 , что, в свою очередь, приводит к уширению резонансных сигналов в спектрах ЯМР и к увеличению спиновой диффузии в 1H NOE-экспериментах [17]. Короткие времена поперечной релаксации T_2 приводят к уменьшению информативности двумерных ЯМР-экспериментов (TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY), необходимых как для отнесения резонансных сигналов, так и для определения

пространственной структуры протеинов в комплексе [17, 18]. Таким образом, частицы такого размера являются неподходящими для двумерных экспериментов, и отсюда следует, что структурные исследования, использующие внутримолекулярные ¹H NOE-эксперименты, ограничены для молекул больших молекулярных масс, связанных с небольшими мицеллами поверхностно-активных веществ.

Известно, что поверхностно-активные вещества образуются амфифильными молекулами, обладающими гидрофобными и гидрофильными участками. Кроме фосфолипидов, формирующих бислои или мультибислои в водных средах, существуют и другие органические соединения, образующие мицеллярные системы, в которых мицеллы рассредоточены по всему объему, находящиеся в быстром обмене с мономерными структурами. Критическая концентрация мицеллообразования поверхностно-активных веществ является концентрацией ПАВ в растворе, при которой в системе образуются в заметных количествах устойчивые мицеллы. Полярная группа мицелл поверхностно-активных веществ в водной среде расположена на оболочке мицеллы, которая является гидрофильной, а центральная часть мицеллы является гидрофобной [15, 16].

В водном растворе мицеллы ведут себя как глобулярные белки, содержащие от 60 мономерных молекул, при этом частицы такого размера имеют относительно небольшое вращательное время корреляции ($\tau_c \sim 5 \cdot 10^{-8}$ с) [12]. Интересным с точки зрения ЯМР-спектроскопии является то, что при связывании протеина с мицеллами образуется комплекс протеин – мицелла, молекулярная масса которого становится больше, чем у несвязанного протеина, что может перевести протеин из разряда малых молекул, подпадающих под условие быстрого обмена, в разряд молекул, подпадающих под условие медленного обмена [17, 18]. Последнее обстоятельство позволяет использовать спектроскопию ЯМР NOESY при решении структурных задач и для небольших по количеству аминокислотных остатков протеинов.

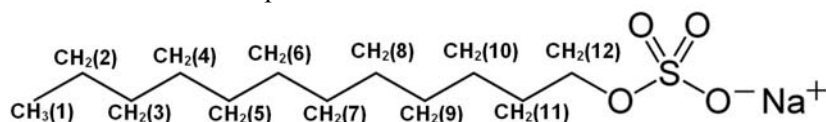


Рис. 8. Структурная формула додецилсульфата натрия

Мицеллярные системы на основе додецилсульфата натрия (ДСН) (рис. 8) образуются в воде при минимальной концентрации 8.1 мМ [12].

Большинство протеинов связывается с мицеллами ДСН в весовом соотношении (1.4 г ДСН и 1 г протеина) [16]. Мицеллы ДСН могут быть использованы для моделирования поведения протеинов на биологических мембранах для небольших гидрофобных протеинов, которые образуют комплексы, связываясь непосредственно с мицеллой ДСН. Отметим, что у синтетических мицелл ДСН, подобно многим биологическим мембранам, имеется поверхностно-отрицательный заряд. От величины этого заряда зависит критическая концентрация мицеллообразования ДСН при формировании мицеллы.

Определение концентрации додецилсульфата натрия в воде, при которой образуются мицеллярные системы, проводили с помощью ЯМР ¹H спектроскопии [19].

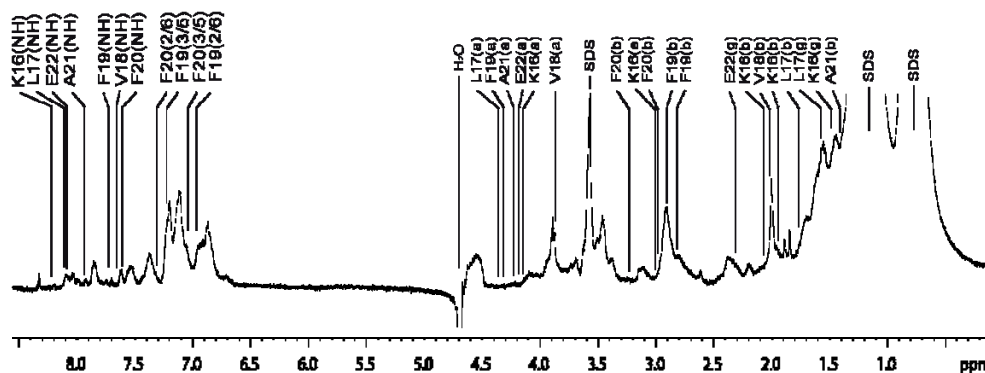


Рис. 9. ЯМР ^1H (500 МГц) спектр гептапептида NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH₂ в растворе H₂O + D₂O с додецилсульфатом натрия, находящемся в мицеллярном состоянии; T 293 К, 0 м.д. соответствует сигналу ЯМР ^1H TMC

Если поместить гептапептид в раствор с мицеллярными образованиями на основе додецилсульфат натрия [15, 16], то можно ожидать образования комплекса протеин – мицелла, молекулярная масса которого будет существенно больше, чем у несвязанного протеина. При этом протеин из разряда малых молекул, для которого сохраняется условие быстрого движения, переходит в разряд молекул, для которых справедливо условие медленного движения, что дает возможность применить метод NOESY спектроскопии ЯМР для установления структуры исследуемого пептида в комплексе с мицеллой.

Была исследована система: гептапептид A β _{16–22} (NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH₂) – водный раствор с додецилсульфатом натрия (ДСН), который использовался в качестве модели мембраны. При концентрации (ККМ) ДСН в растворе больше, чем 4.3 г/л, происходило образование мицелл, что контролировалось с помощью ЯМР ^1H спектроскопии.

ЯМР ^1H спектр гептапептида A β _{16–22} (NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH₂), растворенного с мицеллами на основе додецилсульфата натрия, представлен на рис. 9 (химические сдвиги приведены в табл. 4). Большие по интенсивности сигналы на спектре принадлежат сигналам протонов от ДСН.

Отнесение сигналов в спектре ЯМР ^1H гептапептида A β _{16–22} (NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH₂) в растворе H₂O + D₂O с ДСН сделано на основании двумерных экспериментов ЯМР ^1H - ^1H TOCSY (рис. 10), данных предыдущих исследований и сведений из литературы [8] (табл. 4).

Сравнивая химические сдвиги гептапептида в растворе H₂O + D₂O с додецилсульфатом натрия, находящемся в мицеллярном состоянии (табл. 4), и в растворе боратного буфера (Na₂B₄O₇·10H₂O + D₂O) (табл. 1), можно видеть изменения этих величин. Отличие химических сдвигов в этих растворах, возможно, обусловлено изменением конформации молекулы гептапептида и образованием комплекса гептапептид – мицеллы на основе додецилсульфата натрия. Кроме того, в двумерном ЯМР ^1H NOESY спектре гептапептида наблюдаются кросс-пики положительного знака, что характерно для молекул, подпадающих под условие медленного движения. Все вышеприведенные факты подтверждают образование комплекса гептапептид – мицеллы на основе додецилсульфата натрия.

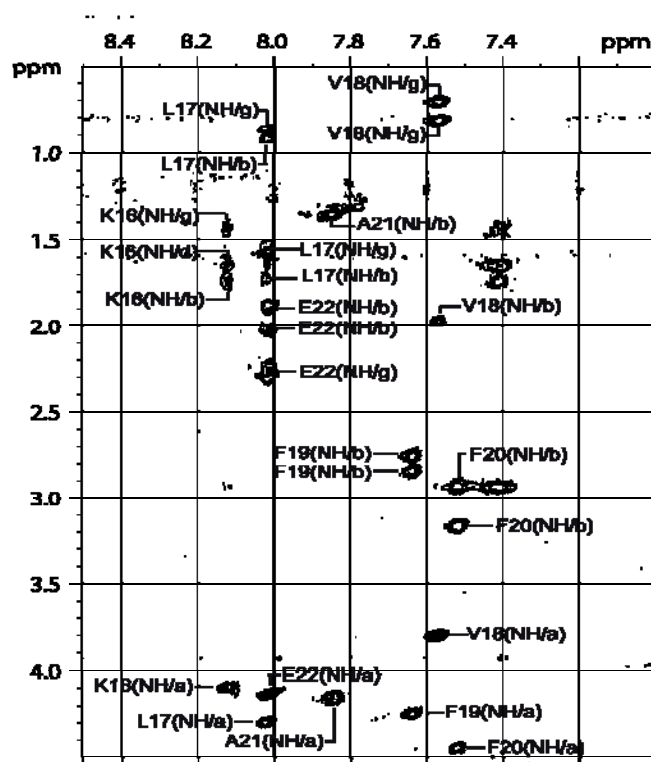


Рис. 10. Область двумерного ^1H - ^1H TOCSY спектра ЯМР (7.2–8.5 м.д.) гептапептида NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH₂ в растворе H₂O + D₂O с додецилсульфатом натрия, находящемся в мицеллярном состоянии; T 293 K, 0 м.д. соответствует сигналу ЯМР ^1H TMC

Табл. 4

ЯМР ^1H химические сдвиги (δ_{H} , м.д., относительно TMC) гептапептида NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH₂ в растворе H₂O + D₂O с додецилсульфатом натрия; T 293 K, раствор боратного буфера (Na₂B₄O₇·10H₂O + D₂O) (в скобках приведены данные химических сдвигов для раствора боратного буфера из табл. 1)

Остаток	Химические сдвиги, м.д.				
	NH	C $_{\alpha}$ H	C $_{\beta}$ H	C $_{\gamma}$ H	прочие
Lys16	7.41	4.10 (4.26)	1.75 (3.00)	1.45	1.65 (δ), 2.94 (ϵ)
Leu17	8.02	4.30 (4.36)	1.72 (1.60)	1.52	0.93(δ_1), 0.86 (δ_2)
Val18	7.57	3.80 (4.06)	1.97 (1.94)	0.82(γ_1), 0.70 (γ_2)	
Phe19	7.64	4.23 (4.20)	2.84; 2.75 (2.07; 2.28)	6.86(2/6); 7.12(3/5)	
Phe20	7.52	4.44 (4.20)	3.17; 2.93 (2.07; 2.28)	7.2 (2/6); 6.95 (3/5)	
Ala21	7.85	4.15 (4.15)	1.36 (1.34)		
Glu22	8.01	4.13 (4.35)	2.02; 1.89 (2.38; 2.11)	2.27	

Для определения межпротонных расстояний, непосредственно характеризующих пространственную геометрию гептапептида A β ₁₆₋₂₂ (NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH₂) в растворе, записывали двумерные ЯМР NOESY спектры

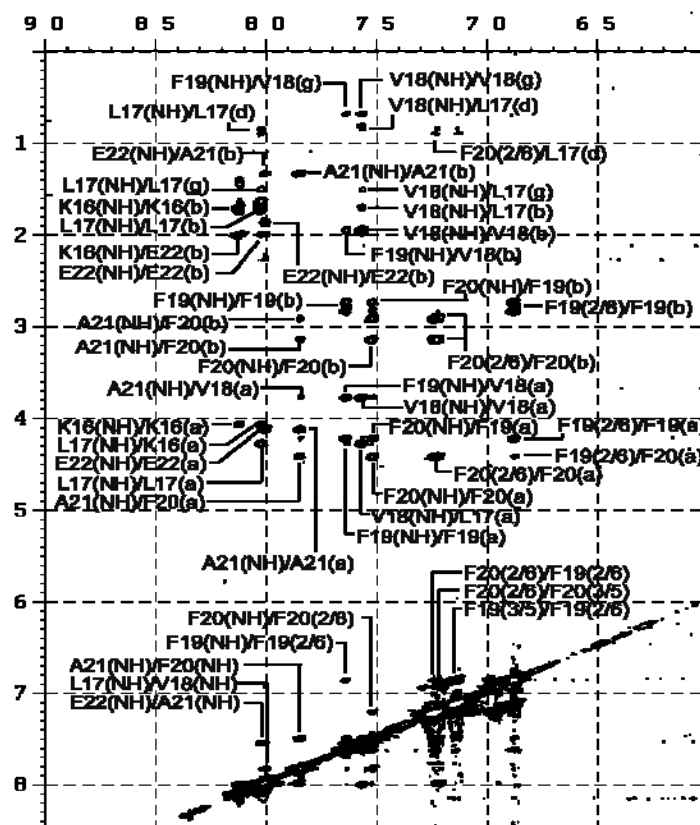


Рис. 11. Область двумерного ЯМР ^1H – ^1H NOESY спектра (6.4–9.0 м.д.) гептапептида $\text{NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH}_2$ в растворе $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$ с додецилсульфатом натрия, находящемся в мицеллярном состоянии; T 293 К, 0 м.д. соответствует сигналу ЯМР ^1H TMS. Время смешивания τ_m 0.4 с

(рис. 11) с вариацией времени смешивания τ_m . Наблюдались кросс-пики в двумерных ЯМР NOESY спектрах между сигналами протонов исследуемого соединения, относящихся к различным аминокислотным фрагментам. Анализируя и обрабатывая данные кросс-пики с использованием методики, изложенной в работе [19], были получены приближенные межпротонные расстояния. Данные приведены в табл. 5. В качестве калибровочной интенсивности кросс-пиков был выбран кросс-пик в ароматическом кольце фенилаланина $\text{Phe19(2/6)}\text{--Phe19(3/5)}$ на основании того, что протоны в нем принадлежат ароматическому кольцу и положение их остается неизменным при любых внешних условиях. Расстояние между этими протонами определяли различными методами и приняли равным 2.49 Å.

С целью установления пространственного строения гептапептида $\text{A}\beta_{16-22}$ в растворе $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$ в присутствии ДСН были проведены расчеты по методу молекулярной механики по программе DYNAMO [11]. Эти расчеты позволили однозначно определить некий конформер как наиболее выгодную структуру для гептапептида (рис. 12, б). В качестве исходных экспериментальных данных использовали межпротонные расстояния, полученные из анализа интенсивностей кросс-пиков ЯМР NOESY спектров гептапептида (табл. 5).

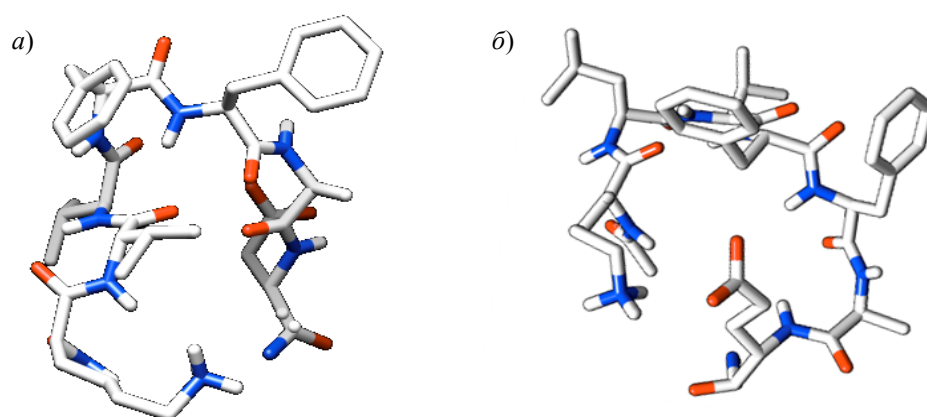


Рис. 12. Пространственное строение гептапептида A β ₁₆₋₂₂ (NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH₂): а) в растворе; б) в комплексе гептапептид – синтетическая модель поверхности мембраны клетки

Табл. 5

Экспериментально определенные межпротонные расстояния для гептапептида NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH₂ в растворе H₂O + D₂O с додецилсульфатом натрия. Звездочкой обозначено калибровочное расстояние

Пара протонов	Межпротонное расстояние r , Å, NOESY	Межпротонное расстояние r , Å, DYNAMO
F19(2/6)/F19(3/5)	2.49*	2.49
E22(NH)/A21(NH)	3.08 ± 0.62	3.48
F19(2/6)/F19(NH)	3.48 ± 0.70	3.08
K16(NH)/K16(a)	3.43 ± 0.69	2.87
K16(NH)/E22(b)	2.93 ± 0.59	3.44
A21(NH)/A21(a)	2.97 ± 0.59	3.01
E22(NH)/E22(b)	4.54 ± 0.91	3.72
E22(a)/E22(b)	3.58 ± 0.72	2.97
A21(NH)/F20(a)	2.54 ± 0.51	3.31
F19(NH)/F19(a)	2.98 ± 0.60	2.73
F19(NH)/V18(a)	3.10 ± 0.62	2.95
F19(NH)/F19(b)	3.30 ± 0.66	3.43
F19(2/6)/F19(a)	3.35 ± 0.67	3.64
F20(NH)/F19(a)	3.27 ± 0.65	3.56
F19(b)/F19(2/6)	3.60 ± 0.72	3.62
V18(NH)/V18(b)	3.02 ± 0.60	3.45
V18(a)/V18(NH)	2.80 ± 0.56	2.83
F19(b)/F19(a)	2.85 ± 0.57	2.85
V18(NH)/V18(g)	3.95 ± 0.79	3.65
V18(a)/V18(b)	3.03 ± 0.61	2.52
V18(g)/V18(a)	4.98 ± 1.00	4.28
F20(NH)/F20(a)	2.45 ± 0.49	2.88
F20(2/6)/F20(a)	2.14 ± 0.43	2.48
F20(NH)/F20(b)	3.12 ± 0.62	2.91
F20(2/6)/F20(b)	2.88 ± 0.58	2.40

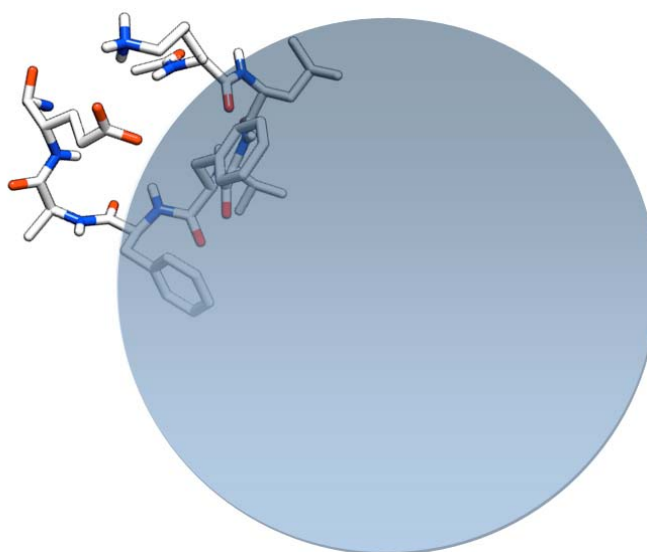


Рис. 13. Строение комплекса гептапептид NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH₂ – мицеллы на основе додецилсульфата натрия

Как следует из рассмотрения рис. 12, пространственное строение гептапептида A β _{16–22} различно в этих двух средах.

Координаты атомов в pdb-формате пространственной структуры A β _{16–22} (NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH₂) в растворе и в комплексе с мицеллами додецилсульфата натрия в H₂O + D₂O можно получить у авторов работы.

Анализируя изменения ЯМР ¹H химических сдвигов протонов гептапептида при переходе от раствора боратного буфера (Na₂B₄O₇·10H₂O + D₂O) к раствору H₂O + D₂O с додецилсульфатом натрия, находящемуся в мицеллярном состоянии (табл. 4), можно на качественном уровне описать пространственное строение самого комплекса гептапептид NAc-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-NH₂ – мицеллы на основе додецилсульфата натрия, который представлен на рис. 13.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 09-03-00077а), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России».

Summary

K.S. Usachev, A.R. Yulmetov, A.V. Filippov, O.N. Antsutkin, S. Afonin, A.V. Aganov, V.V. Klochkov. Spatial Structure of Heptapeptide A β _{16–22} in a Solution and in the Complex between the Heptapeptide and a Model Biological Membrane.

The spatial structure of an active fragment of beta-amyloid A β _{1–40} heptapeptide A β _{16–22} (Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu) in a solution and the spatial structure of the complex between the heptapeptide and a model cell membrane surface (a micelle based on sodium dodecyl sulfate) were investigated and described by ¹H NMR spectroscopy and two-dimensional NMR (TOCSY, HSQC-HECADE, NOESY) spectroscopy. The complexation was confirmed by the change in the chemical shifts in the heptapeptide's ¹H NMR spectra as well as by the signs and values of the nuclear Overhauser effect (NOE) in various media. A comparison of the

heptapeptide's spatial structure in a borate buffer solution and its structure in the complex between Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu and the model cell membrane surface was made.

Key words: structure, beta-amyloid, micelles, NMR ¹H spectroscopy, two-dimensional NMR (TOCSY, HSQC-HECADE, NOESY) spectroscopy.

Литература

1. Coles M., Bicknell W., Watson A., Fairlie D.P., Craik D.J. Solution Structure of Amyloid β -Peptide (1–40) in a Water-Micelle Environment. Is the Membrane-Spanning Domain Where We Think It Is? // *Biochemistry*. – 1998. – V. 37, No 31. – P. 11064–11077.
2. Balbach J.J., Ishii Y., Antzutkin O.N., Leapman R.D., Rizzo N.W., Dyda F., Reed J., Tycko R. Amyloid fibril formation by Ab 16–22, a seven-residue fragment of the Alzheimer's b-amyloid peptide, and structural characterization by solid state NMR // *Biochemistry*. – 2000. – V. 39. – P. 13748–13759.
3. Aisenbrey C., Borowik T., Byström R., Bokvist M., Lindström F., Misiak H., Sani M.A., Gröbner G. How is protein aggregation in amyloidogenic diseases modulated by biological membranes? // *Eur. Biophys. J.* – 2008. – V. 37, No 3. – P. 247–255.
4. Merrifield R.B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide // *J. Am. Chem. Soc.* – 1963. – V. 85, No 14. – P. 2149–2154.
5. Jones J. Amino Acid and Peptide Synthesis. – N. Y.: Oxford Univ. Press, 2002. – 96 p.
6. Filippov A. Synthesis and aggregation studies on amyloid oligomers of Alzheimer's Abeta peptides: Licentiate of Technology Thesis. – Lulea, Sweden: Lulea Univ. Technol., 2010. – 26 p.
7. Breitmaier E., Woelter W. ¹³C NMR spectroscopy. Methods and application in organic chemistry. – Weinheim, N. Y.: Verlag Chemie, 1978. – 322 p.
8. Wuthrich K. NMR of proteins and nucleic acids. – N. Y.: Wiley-VCH, 1986. – 320 p.
9. Kozminski W., Nanz D. Sensitivity improvement and new acquisition scheme of heteronuclear active-coupling-pattern-tilting spectroscopy // *J. Magn. Res.* – 2000. – V. 142, No 2. – P. 294–299.
10. Ruckert M., Otting G. Alignment of biological macromolecules in novel nonionic liquid crystalline media for NMR experiments // *J. Am. Chem. Soc.* – 2000. – V. 122, No 32. – P. 7793–7797.
11. Delaglio F. NMRpipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes // *J. Biomol. NMR*. – 1995. – V. 6, No 3. – P. 277–293.
12. Henry G.D., Sykes B.D. Methods to study membrane protein structure in solution // *Meth. Enzymol.* – 1994. – V. 239. – P. 515–535.
13. Lee K.H., Fitton J.E., Wüthrich K. Nuclear magnetic resonance investigation of the conformation of δ -haemolysin bound to dodecylphosphocholine micelles // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1987. – V. 911, No 2. – P. 144–153.
14. Braun W., Wider G., Lee K.H., Wüthrich K. Conformation of glucagon in a lipid-water interphase by ¹H nuclear magnetic resonance // *J. Mol. Biol.* – 1983. – V. 169, No 4. – P. 921–948.
15. Motta A., Pastore A., Goud N.A., Castiglione Morelli M.A. Solution conformation of salmon calcitonin in sodium dodecyl sulfate micelles as determined by two-dimensional NMR and distance geometry calculations // *Biochemistry*. – 1991. – V. 30, No 43. – P. 10444–10450.
16. Wang G., Keifer P., Peterkofsky A. Solution structure of the N-terminal amphitropic domain of *Escherichia coli* glucose-specific enzyme IIA in membrane-mimetic micelles // *Protein Sci.* – 2003. – V. 12, No 5. – P. 1087–1096.

17. *Ernst R.R., Bodenhausen B., Wokaun A.* Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions. – Oxford: Oxford Univ. Press, 1987. – 610 p.
18. *Berger S., Braun S.* 200 and More NMR Experiments. – Weinheim: Wiley-VCH, 2004. – 810 p.
19. *Блохин Д.С., Ефимов С.В., Клочков А.В., Юльметов А.Р., Филиппов А.В., Клочков В.В.* Пространственное строение декапептида Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly в комплексе протеин – мицеллы додецилсульфата натрия // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2011. – Т. 153, кн. 1. – С. 59–70.
20. *Bremer J., Mendz G.L., Moore W.J.* Skewed exchange spectroscopy. Two-dimensional method for the measurement of cross relaxation in proton NMR spectroscopy // J. Am. Chem. Soc. – 1984. – V. 106. – P. 4691–4696.

Поступила в редакцию
17.07.11

Усачев Константин Сергеевич – аспирант кафедры общей физики Казанского (Приволжского) федерального университета.

Юльметов Айдар Рафаилович – кандидат физико-математических наук, ассистент кафедры общей физики Казанского (Приволжского) федерального университета.

Филиппов Андрей Васильевич – доктор физико-математических наук, профессор кафедры физики молекулярных систем Казанского (Приволжского) федерального университета.

Анцуткин Олег Николаевич – Ph.D. in Chemistry, профессор департамента прикладной химии и геологии Университета Лулео, Швеция.

Афонин Сергей – Ph.D. in Chemistry, научный сотрудник Технологического института Карлсруэ, Германия.

Аганов Альберт Вартанович – доктор химических наук, профессор кафедры общей физики, директор Института физики Казанского (Приволжского) федерального университета.

Клочков Владимир Васильевич – доктор химических наук, профессор кафедры общей физики Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: vladimir.klochkov@ksu.ru