

конформаций проведен на основе значений эффективных зарядов, орбитальной энергии, дипольных моментов. Изменение этих параметров при переходе от одной конформации к другой позволяет определить конформационно-электронную обусловленность низкоэнергетических структур. Анализируя динамику изменения эффективных зарядов конкретных атомов можно выявить относительно консервативные и чувствительные к конформационным перестройкам участки молекулы.

Дипольных моментов молекулы в разных конформациях заметно отличаются и наблюдается тенденция к увеличению дипольного момента с увеличением относительной энергии. Исключение составляет конформация 4, которая имеет относительно компактное пространственное строение со сближенными противоположно заряженными участками. Поэтому молекула в этом состоянии характеризуется меньшей величиной дипольного момента. Эта тенденция наблюдается и при анализе энергий верхней заполненной и нижней свободной молекулярных орбиталей молекулы в этой конформации. Как видно из таблицы 3, наблюдается уменьшение величины энергии верхней заполненной молекулярной орбитали с увеличением относительной конформационной энергии для конформаций 1-3, 5 и 6. Исключение составляет конформация 4, для которой характерно изменение пространственной структуры, связанной с конформационными перестройками концевых участков. Аналогичные выводы можно сделать и при анализе величин эффективных зарядов, рассчитанных для всех конформаций молекулы. Существенные различия касаются, в основном, атомов молекулы в конформации 4.

Методом молекулярной динамики исследованы динамические свойства молекулы CREKA. Полученные результаты согласуются с данными квантово-химических расчетов и будут использованы для изучения конформационно-динамических свойств аналогов молекулы CREKA.

Список литературы / References:

1. Farokhzad O.C., Cheng J.J., Teply B.A., Sherifi I., Jon S., Kantoff P.W., Ritchie J.P., Langer R. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy *in vivo*. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 2006, vol. 103 (116), p. 6315-6320.
2. Montet X., Weissleder R., Josephson L. Imaging pancreatic cancer with a Peptide-nanoparticle conjugate targeted to normal pancreas. *Bioconjug. Chem.*, 2006, vol. 17, no. 4, pp. 905-911.
3. Couvreur P., Vauthier C. Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. *Pharmaceutical Research*, 2006, vol. 23 (7), pp. 1417-1450.
4. Sunderland C.J., Steiert M., Talmadge J.E., Derfus A.M., Barry S.E. Targeted nanoparticles for detecting and treating cancer. *Drug Dev. Res.*, 2006, vol. 67, pp. 70-93.
5. Yih T.C., Al-Fandi M. Engineered Nanoparticles as Precise Drug Delivery Systems. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2006, vol. 97, pp. 1184-1190.
6. Simberg D., Duza T., Park J.H., Essler M., Pilch J., Zhang L., Derfus A.M., Yang M., Hoffman R.M., Bhatia S., Sailor M.J., Ruoslahti E. Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors. *PNAS*, 2007, vol. 104, no. 3, pp. 932-936.
7. Popov E.M. Quantitative approach to conformations of proteins. *Int. J. Quantum Chem.*, 1979, vol. 16, pp. 707-737
8. Попов Е.М. *Структурная организация белков*. М.: Наука, 1989, 352 с. [Popov E.M. *Strukturnaya organizatsiya belkov*. М.: Nauka, 1989, 352 p. (In Russ.)]

ПРЯМОЕ НАБЛЮДЕНИЕ АМИЛОИДНОЙ АГРЕГАЦИИ А-БЕТА ПЕПТИДА 1-40 НА ПОВЕРХНОСТИ СТЕКЛА

Балобанов В.А., Турчина А.И., Елисеева И.А., Бычкова В.Е.

ФГБУН Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пуццоно, 142290, РФ

e-mail: uralm62@rambler.ru

Аннотация. Поиск закономерностей и физических основ первых стадий амилоидной агрегации вот уже на протяжении десятилетий остаётся важной задачей физики белковых молекул. Существуют определённые аналогии между процессами амилоидной агрегации и кристаллизации. В обоих случаях раствор является пересыщенным, и появление затравки новой фазы приводит к лавинообразному переходу растворённого белка в кристаллы или амилоидные фибриллы. В данной работе проведено спектральное и микроскопическое исследование агрегации А-бета пептида на поверхности стекла. Экспериментально показано, что стеклянная поверхность может сорбировать молекулы А-бета пептида и тем самым приводить к увеличению их способности к агрегации, в том числе и амилоидной. Появление фазы сорбированного белка на поверхности может влиять на агрегацию пептидов в толще раствора. Необходимость учёта такого влияния является очевидной в любом исследовании белковой агрегации.

Ключевые слова: амилоидная агрегация, А-бета пептид, нуклеация, адсорбция.

DIRECT OBSERVATION OF AMYLOID AGGREGATION OF A-BETA 1-40 PEPTIDES ON THE GLASS SURFACE.

Balobanov V.A., Turchina A.I., Eliseeva I.A., Bychkova V.E.

Institute of protein research RAS

*Institutskaya st. 4, Pushchino, 142290, Russia**e-mail: uralm62@rambler.ru*

Abstract. Search of the physical foundations of the first stages of amyloid aggregation remains an important objective of the protein physics for a last few decades. There are certain analogies between processes amyloid aggregation and crystallization. In both cases, the solution is supersaturated, and the appearance of seed of new phase leads to a cascade of crystallization or protein amyloid fibrils formation. In this work spectral and microscopic investigation of the A-beta peptide aggregation on the glass surface were done. It is shown experimentally that the glass surface can sorb molecules of A-beta peptide, and thereby lead to an increase in their ability to aggregate, including amyloid. The appearance of phase of protein adsorbed on the surface can affect the aggregation of peptides in bulk solution. The need for taking into account this influence is evident in any study of protein aggregation.

Key words: amyloid aggregation, A-beta peptides, nucleation, adsorption.

Амилоидная агрегация остаётся одной из наиболее исследуемых тем биофизики белковых молекул. Большие усилия направлены на исследование первых стадий агрегации – образование зародышей амилоидных фибрилл. Многие исследователи предполагают их спонтанное появление в растворе [1]. Такая интерпретация проводит аналогию между процессом амилоидной агрегации и процессами кристаллизации. Аналогию амилоидообразования с кристаллизацией проводит и Goto в своих последних работах [2], однако, лишь в аспекте пересыщенности раствора и наличия альтернативного пути неспецифической агрегации. Как известно, в реальных условиях кристаллизация начинается на неоднородностях – пылинках, дефектах поверхности и т.д. При этом скорость кристаллизации на таких неоднородностях значительно превышает скорость спонтанной кристаллизации из раствора. Если развивать эту аналогию, то возможно подойти к объяснению главной проблемы экспериментального исследования кинетики образования амилоидных фибрилл. Такой проблемой на пути исследования часто становится плохая воспроизводимость результатов. Поиски решения этой проблемы привели нас к двум возможным объяснениям. Первое – такова природа процесса агрегации. То есть случайное единичное событие приводит к запуску агрегации. Второе – есть фактор, систематически не учитываемый исследователями. Скорее эти два объяснения объединены в одно: неучтённый фактор приводит к появлению затравок. Данной работой мы начинаем поиск факторов, которые могут оказывать значительное влияние на процесс амилоидообразования, однако часто не учитываются или не контролируются.

Первоочередной интерес представляет влияние поверхности кюветы или пробирки, в которой образуются амилоидные агрегаты. Такой интерес легко объяснить. С одной стороны, есть работы, показывающие, что поверхность может модулировать процесс агрегации [3-6]. Но, с другой стороны, в большинстве работ по исследованию кинетики образования амилоидных агрегатов вопрос влияния поверхности на процесс, происходящий в объёме, опускается. Для выяснения процессов, происходящих на поверхности стекла, в условиях наших экспериментов были проведены исследования агрегации А-бета пептида. Для наблюдения были использованы А-бета пептиды 1-40 меченные флуоресцентными красителями Су5 и Су3. Одна половина была помечена красителем Су3, который служил донором флуоресценции, вторая половина красителем Су5, который служил акцептором. Модификация проводилась по N-концу пептида, который в структуре амилоидных фибрилл не входит в их кросс-бета остов [7]. При взаимодействии между пептидами, которое характерно для амилоидной агрегации, происходит сближение N-концов пептидов и меток, пришитых к ним. Это сближение, в свою очередь, приводит к переносу флуоресцентной энергии с одного красителя на другой, что и служит регистрируемым сигналом.

Эксперимент, показывающий возможность агрегации и её наблюдения с использованием метода переноса флуоресцентной энергии был проведён следующим образом: на стекло был нанесён раствор пептида, меченного красителем Су3, затем к нему добавлен раствор пептида, меченного красителем Су5. После этого при возбуждении на длине волны 540нм (возбуждения донора Су3) наблюдается пик флуоресценции на длине волны 660нм (флуоресценция акцептора Су5). После измерения стекло было промыто буфером, и повторно снят спектр флуоресценции. Так же как и в предыдущем измерении наблюдался хороший пик флуоресценции акцептора. На основании этого результата можно сделать выводы о том, что пептиды специфически взаимодействуют и достаточно прочно сорбированы на поверхности стекла. Результаты приведены на рисунке 1.

Для подтверждения локализации взаимодействующих пептидов были предприняты микроскопические исследования. Был использован конфокальный флуоресцентный микроскоп. Проводилось послойное сканирование препарата смеси флуоресцентно меченых пептидов. Полученные данные приведены на рисунке 2.

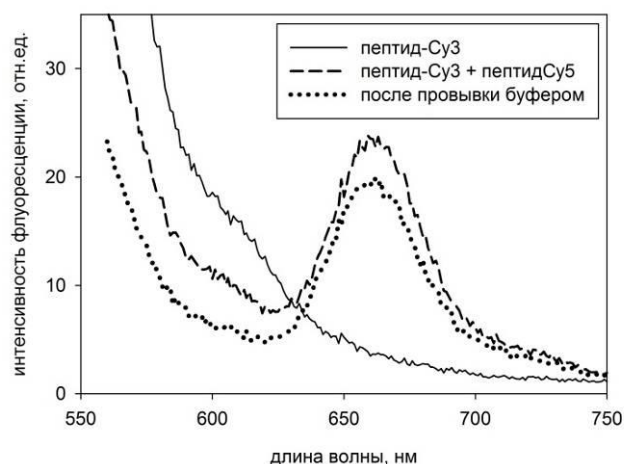


Рисунок 1 – Спектральные исследования взаимодействия флуоресцентно меченных А-бета пептидов. Сплошная линия – спектр флуоресценции пептида, меченного Су3, пунктирная линия – флуоресценция смеси меченых пептидов, точечная линия – спектр флуоресценции пептидов, сорбированных на стекле

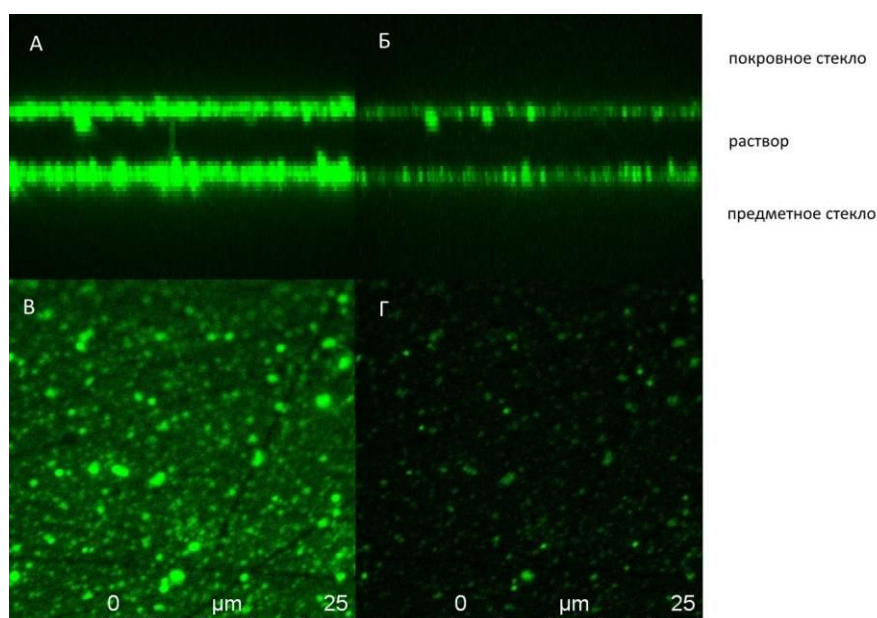


Рисунок 2 – Результаты флуоресцентно-микроскопического исследования. А - боковая проекция суммарной флуоресценции, Б - боковая проекция флуоресценции акцептора, В - суммарная флуоресценция, Г - флуоресценция акцептора

При исследовании препаратов флуоресцентным конфокальным микроскопом видно (см. рис. 2), что пептиды сосредоточены на поверхности предметного и покровного стёкол. Там же наблюдается и перенос флуоресцентной энергии. При этом в растворе практически не остаётся пептида. Такой результат показывает, что при данной концентрации пептида в растворе он практически весь сорбирован на стёклах и не может участвовать в агрегации и формировании фибрилл в толще раствора. При этом пептид сорбированный на стекле специфически агрегирует, что приводит к сближению флуоресцентных меток и передаче энергии между ними.

Возникает резонный вопрос: взаимодействие происходит между уже сорбированными белками или сначала происходит агрегация, а потом сорбция? Для ответа на этот вопрос был поставлен следующий эксперимент. Поверхность стекла была обработана раствором БСА. После такой обработки стекло оказывается покрыто слоем белка и недоступно для дальнейшей сорбции. Затем проведён эксперимент, аналогичный первому. Результаты приведены на рисунке 3.

Как видим, при добавлении пептида, меченного Су5, к пептиду, меченному Су3, на стекле, покрытом БСА, не происходит значительного увеличения пика флуоресценции на длине волны 660 нм. Этот результат говорит об отсутствии сорбции и специфической агрегации А-бета пептида. А раз это так, то для взаимодействия и агрегации пептидов в данных условиях необходима поверхность стекла.

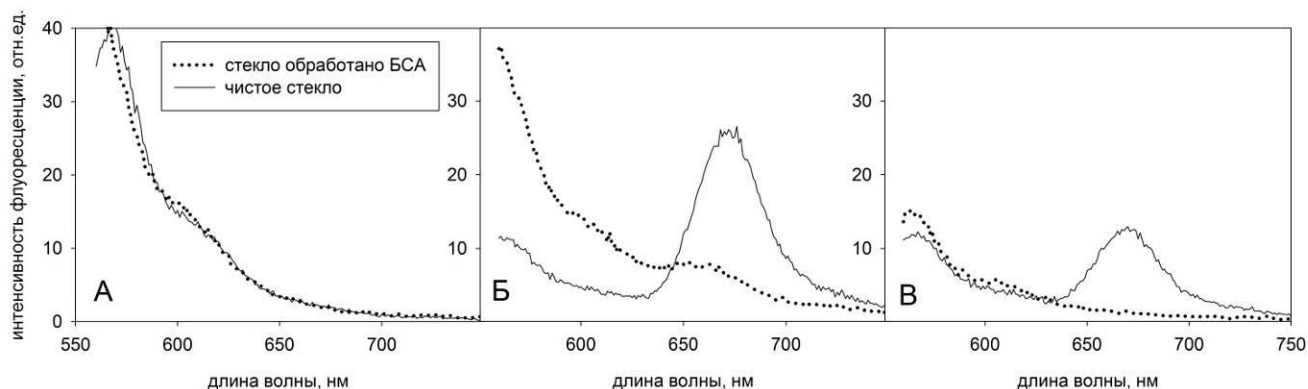


Рисунок 3 – Сравнение взаимодействия флуоресцентно меченных А-бета пептидов на стекле, обработанном БСА (точечная линия), и чистом стекле (сплошная линия). А – спектры флуоресценции пептида, меченного Су3, Б – спектры флуоресценции смеси меченых пептидов, В – спектр флуоресценции пептидов, сорбированных на стекле

Полученные результаты позволяют сделать вывод о склонности А-бета пептида к сорбции на поверхности стекла и последующей агрегацией на нём. Причём эти процессы идут намного интенсивней агрегации А-бета пептида в толще раствора. Можно предположить, что именно на поверхности происходит появление первых затравок амилоидных фибрилл. Такое предположение приводит к ряду важных следствий. Для молекулярной и клеточной биологии это означает ведущую роль мембран, которые могут служить поверхностью, с которой начинается образование амилоидных агрегатов *in vivo*. Для физики белка это значит, что в любом исследовании амилоидной агрегации необходимо показывать степень влияния поверхности кюветы или пробирки, в которых производится измерение. В противном случае интерпретация экспериментальных данных может являться не полной или вовсе ошибочной, поскольку математические модели, используемые для описания процесса амилоидной агрегации, как правило, не учитывают образования затравок на поверхности.

Материалы и методы.

Пептиды были получены в соответствии и методикой, использованной в статье [8]. Генетические конструкции были предоставлены группой биоинформатики ИБ РАН. Полученные пептиды были химически модифицированы с присоединением флуоресцентных меток Су3 и Су5 к N-концу. Реакцию проводили в соответствии с инструкцией производителя метки. Меченые пептиды очищали при помощи эксклюзионной хроматографии.

Флуоресцентная спектроскопия. Флуоресценция измерялась на поверхности стекла при помощи спектрофлуориметра Cary Eclipse. Длина волны возбуждения составляла 540 нм (возбуждение Су3). Регистрация в диапазоне длин волн 550-750 нм. Перенос энергии определяли по возрастанию флуоресценции акцептора (Су5) на длине волны 660 нм.

Конфокальная флуоресцентная микроскопия. Микроскопическое исследование проводили с использованием флуоресцентного конфокального микроскоп Leica TCS SPE. Длина волны возбуждения 513 нм (возбуждается донор Су3). Регистрировали общую флуоресценцию (диапазон 550-750 нм) или только флуоресценцию акцептора (диапазон 650-750 нм).

Получение и выделение пептидов поддержано грантом РФФИ 14-14-00536, эксперименты по исследованию агрегации поддержаны грантом РФФИ 14-24-00157.

Список литературы / References:

1. Ghosh P., Vaidya A., Kumar A., Rangachari V. Determination of critical nucleation number for a single nucleation amyloid- β aggregation model. *Math Biosci.*, 2016, vol. 273, pp. 70-79.
2. So M., Hall D., Goto Y. Revisiting supersaturation as a factor determining amyloid fibrillation. *Curr Opin Struct Biol.* 2016, vol. 36, pp. 32-39.
3. Ni R., Kleijn J.M., Abeln S., Cohen Stuart M.A., Bolhuis P.G. Competition between surface adsorption and folding of fibril-forming polypeptides. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.*, 2015, vol. 91, pp. 022711.
4. Jiang D., Dinh K.L., Ruthenburg T.C., Zhang Y., Su L., Land D.P., Zhou F. A kinetic model for beta-amyloid adsorption at the air/solution interface and its implication to the beta-amyloid aggregation process. *J. Phys. Chem. B*, 2009, vol. 113, pp. 3160-3168.
5. Du Q., Dai B., Hou J., Hu J., Zhang F., Zhang Y. A comparative study on the self-assembly of an amyloid-like peptide at water-solid interfaces and in bulk solutions. *Microsc. Res. Tech.*, 2015, vol 78, pp. 375-381.
6. Lin Y.C., Petersson E.J., Fakhraai Z. Surface effects mediate self-assembly of amyloid- β peptides. *ACS Nano*, 2014, vol. 8, pp. 10178-10186.
7. Paravastu A.K., Leapman R.D., Yau W.M., Tycko R. Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2008, vol. 105, pp. 18349-18354
8. Dovidchenko N.V., Glyakina A.V., Selivanova O.M., Grigorashvili E.I., Suvorina M.Y., Dzhus U.F., Mikhailina A.O., Shiliaev N.G., Marchenkov V.V., Surin A.K., Galzitskaya O.V. One of the possible mechanisms of amyloid fibrils formation based on the sizes of primary and secondary folding nuclei of A β 40 and A β 42. *J Struct Biol.*, 2016, vol. 22.