

6. Сидорин Е.В., Сидорова О.В., Тищенко Н.М., Хоменко В.А., Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф. Шаперонная активность иммуноглобулинсвязывающего белка *Yersinia pseudotuberculosis*. *Биологические мембраны*, 2015, т. 32, № 3, с. 217-220. [Sidorin E.V., Sidorova O.V., Tishchenko N.M., Khomenko V.A., Novikova O.D., Solov'eva T.F. Chaperone Activity of Immunoglobulin-binding Protein from *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochemistry, Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2015, vol. 32, no. 3, pp. 217-220 (in Rus.)]

7. Сидорин Е.В., Тищенко Н.М., Хоменко В.А., Исаева М.П., Дмитренко П.С., Ким Н.Ю., Лихацкая Г.Н., Соловьева Т.Ф. Молекулярное клонирование, выделение и характеристика шаперона Skp из *Yersinia pseudotuberculosis*. *Биохимия*, 2012, том 77, № 11, с. 1571-1583. [Sidorin E.V., Tishchenko N.M., Khomenko V.A., Isayeva M.P., Dmitrenok P.S., Kim N.Yu., Likhatskaya G.N., Solovyeva T.F. Molecular cloning, isolation and characterization of chaperone Skp from *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochemistry (Moscow)*, 2012, vol. 77, no. 11, pp. 1571-1583 (in Rus.)]

8. Сидорин Е.В., Хоменко В.А., Ким Н.Ю., Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф. Промежуточные состояния в сворачивании порообразующего белка *OmpF Yersinia pseudotuberculosis* и их структурные характеристики. *Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ – 2016*, Севастополь, 2016, с. 132-136. [Sidorin E.V., Khomenko V.A., Kim N.Yu., Novikova O.D., Solov'eva T.F. Intermediates states in *Yersinia pseudotuberculosis* porin folding and their structural characteristics. *Aktualnie voprosy biologicheskoy fiziki i himii. BFFH-2016*, Sevastopol, 2016, pp. 132-136. (in Rus.)]

9. Vincentelli R., Canaan S., Campanacci V., Calencia C., Maurin D., Frassinetti F., Scappucini-Calvo L., Bourne Y., Cambillau C., Bignon C. High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies. *Protein Science*, 2004, vol. 13, pp. 2782-2792.

### ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА АМИЛОИДООБРАЗОВАНИЯ НА ПРИМЕРЕ ФРАГМЕНТОВ А $\beta$ ПЕПТИДА (А $\beta$ 16-25, А $\beta$ 31-40, А $\beta$ 33-42). НОВАЯ МОДЕЛЬ ФОРМИРОВАНИЯ ФИБРИЛЛ

Селиванова О.М., Глякина А.В., Горбунова Е.Ю., Мустаева Л.Г., Суворина М.Ю., Григоращвили Е.И., Никулин А.Д., Суринов А.К., Галзитская О.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка РАН

Проспект науки, 4, г. Пущино, Московская область, 142290, РФ

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института биорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Проспект науки, 6, г. Пущино, Московская область, 142290, РФ

e-mail: seliv@vega.protres.ru; ogalzit@vega.protres.ru

**Аннотация.** С помощью биоинформатических методов исследования в А $\beta$ 1-42 пептиде были определены амилоидогенные участки А $\beta$ 16-25, А $\beta$ 31-40 и А $\beta$ 33-42, отвечающие за формирование фибрилл. Фрагменты были синтезированы в достаточных количествах, а качество препаратов проверено с помощью масс-спектрометрического анализа. Для исследования их амилоидогенных свойств были применены методы флуоресцентной спектроскопии (связывание с ThT), электронной микроскопии, рентгеноструктурного анализа (РСА). Все три фрагмента в условиях 5% DMSO и 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) взаимодействуют с ThT. При этом фрагменты А $\beta$ 31-40, А $\beta$ 33-42 полимеризуются в виде фибрилл разной морфологии, а фрагмент А $\beta$ 16-25 формирует не свойственные для большинства амилоидов полимеры в виде пленок. Согласно данным рентгеноструктурного анализа фибриллы всех фрагментов показывают наличие двух основных рефлексов (4,6-4,8 Å и 8-12 Å), характерных для кросс- $\beta$  структуры, что указывает на их амилоидную структуру. Анализ экспериментальных данных и структурное моделирование позволило заключить, что основным строительным блоком при формировании фибрилл фрагментами А $\beta$ 1-42 пептида является кольцевой олигомер. Взаимодействие кольцевых олигомеров различным образом приводит к формированию полимеров разной морфологии. На основании совокупности данных предложена новая модель фибриллообразования.

**Ключевые слова:** А $\beta$  пептид, амилоидогенные фрагменты А $\beta$ 1-42 пептида, амилоиды, биоинформатика, новая модель амилоидообразования.

**STUDIES OF THE AMYLOID FORMATION PROCESS BY THE EXAMPLE OF A $\beta$  PEPTIDE FRAGMENTS (A $\beta$ 16-25, A $\beta$ 31-40, A $\beta$ 33-42). NEW MODEL OF FIBRIL FORMATION**

Selivanova O.M., Gorbunova E.Yu., Mustaeva L.G., Grigorashvili E.I.,

Suvorina M.Yu., Nikulin A.D., Surin A.K., Galzitskaya O.V.

Federal State Budgetary Research Institution "Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences",

*Nauka av., 4, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia*

Branch of Federal State Budgetary Research Institution "M.M.Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences",

*Nauka av., 4, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia**e-mail: seliv@vega.protres.ru; ogalzit@vega.protres.ru*

**Abstract.** Using bioinformatics methods of investigation, amyloidogenic regions of A $\beta$ 16-25, A $\beta$ 31-40, and A $\beta$ 33-42, responsible for the formation of fibrils, were determined in the A $\beta$ 1-42 peptide. Fragments were synthesized in sufficient quantities, and the quality of the preparations was verified by mass spectrometric analysis. To study their amyloidogenic properties, methods of fluorescence spectroscopy (ThT binding), electron microscopy, and X-ray diffraction analysis were used. All three fragments under conditions of 5% DMSO and 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) interact with ThT. At the same time fragments of A $\beta$ 31-40 and A $\beta$ 33-42 polymerize in the form of fibrils of different morphology, and fragment A $\beta$ 16-25 form polymers that are not typical of most amyloids in the form of films. According to X-ray diffraction data, the fibrils of all fragments show the presence of two main reflexes (4.6-4.8 Å and 8-12 Å), characteristic of the cross- $\beta$  structure, indicating their amyloid structure. Analysis of the experimental data and structural modeling allowed us to conclude that the main building block in the formation of fibrils by fragments of A $\beta$ 1-42 peptide is a ring oligomer. The interaction of ring oligomers in different ways leads to the formation of polymers of different morphologies. Based on the data set, a new model of fibrillation was proposed.

**Key words:** A $\beta$  peptide, amyloidogenic fragments of A $\beta$ 1-42 peptide, amyloids, bioinformatics, new model of fibrillation

A $\beta$  пептид связывают с таким нейродегенеративным заболеванием, как болезнь Альцгеймера (БА). Одним из признаков заболевания БА является наличие в мозге человека агрегатов (депозитов), состоящих из фибрилл A $\beta$ 1-42 пептида. Отложения в виде агрегатов амилоидных фибрилл свойственны для многих нейродегенеративных заболеваний (болезнь Паркинсона, синдрома Хантингтона и др.). Изучению необычного поведения белков/пептидов, приводящего к формированию фибрилл и их агрегации в крупные фибриллярные образования, уделяется большое внимание, поскольку понимание этого процесса поможет найти правильные подходы к разработке лекарственных препаратов, предотвращающих самоагрегацию амилоидных белков/пептидов на самых ранних ее этапах. Процесс амилоидообразования для различных амилоидных белков носит сходный характер: дестабилизация нативного белка, агрегация дестабилизированных молекул в олигомерные частицы, формирование фибрилл. С помощью биоинформатических методов установлено, что аминокислотные последовательности амилоидогенных белков/пептидов содержат фрагменты, наиболее склонные к формированию фибрилл. Такие короткие участки последовательности представляют интерес не только для проверки теоретических методов исследования, но и для изучения процесса амилоидообразования (легче синтезируются, быстрее формируют фибриллы). Кроме того именно они, согласно данным по обработке зрелых фибрилл различными протеазами, входят в остов фибриллы [1]. Ранее было показано, что целые A $\beta$ 1-40 и A $\beta$ 1-42 пептиды сложны для исследований. Их поведение сильно зависит не только от условий приготовления (ионные условия среды, pH, температура и т.д.), способа получения (синтетические, рекомбинантные), но и от фирмы производителя [2].

В последовательности A $\beta$ 1-42 пептида были предсказаны два амилоидогенных фрагмента – A $\beta$ 16-21 (KLVFFA) и A $\beta$ 32-36 (IGLMV) [3], а для изучения их амилоидогенных свойств были синтезированы 10-членные фрагменты: A $\beta$ 16-25, A $\beta$ 31-40 и A $\beta$ 33-42. Последние два фрагмента были синтезированы для выяснения роли C-концевых аминокислотных остатков на морфологию фибрилл, поскольку ранее нами было показано, что фибриллы пептидов A $\beta$ 1-40 и A $\beta$ 42 имеют разную морфологию [4]. Все три фрагмента были изучены с помощью методов, обычно используемых при исследовании процесса формирования фибрилл: связывание с ThT, ЭМ, PCA. Все эксперименты проводили при концентрациях препаратов 0,25-0,5 мг/мл в условиях 5 % DMSO, 50 mM Трис-HCl (pH 7,5) и инкубации при 37°C. Согласно данным флуоресцентного анализа все три фрагмента взаимодействуют с ThT, что указывает на наличие в трех препаратах  $\beta$ -структуры. Однако, формы кривых для разных пептидов различаются, что может свидетельствовать о разном поведении препаратов при полимеризации.

Согласно данным электронно-микроскопического анализа все три пептида способны к самоорганизации в полимерные структуры. При этом фрагменты A $\beta$ 31-40 агрегирует в виде лент и пучков, A $\beta$ 33-42 в виде шероховатых жгутов, а фрагмент A $\beta$ 16-25 демонстрирует необычную полимеризацию для амилоидогенных фрагментов в виде пленок (см. рис.1).

При большом увеличении заметно, что все полимеры построены из кольцевых олигомеров с наружным диаметром около 6-7 нм, внутренним диаметром около 2-3 нм, а в местах перегиба самых тонких фибрилл наблюдается размер около 3 нм, что дает приблизительную высоту кольца. Такие олигомеры могут ассоциировать друг с другом боковыми сторонами или слегка перекрывать друг друга и формировать ленты, ассоциировать торцевыми сторонами и формировать пучки (A $\beta$ 31-40) или ассоциировать нерегулярным образом с формированием жгутов разного диаметра с шероховатой поверхностью (A $\beta$ 33-42). В случае пептида A $\beta$ 16-25 олигомеры ассоциируют

бок-о-бок и формируют структуры в виде пчелиных сот. Следует отметить, что морфология фибрилл фрагментов A $\beta$ 31-40 и A $\beta$ 33-42 напоминает морфологию фибрилл целых A $\beta$ 1-40 и A $\beta$ 1-42 пептидов. Для A $\beta$ 1-40 пептида показана преимущественная самосборка в виде лент разного диаметра и перекручивания с разным периодом, а для A $\beta$ 1-42 формирование шероховатых жгутов разного диаметра [2, 4].

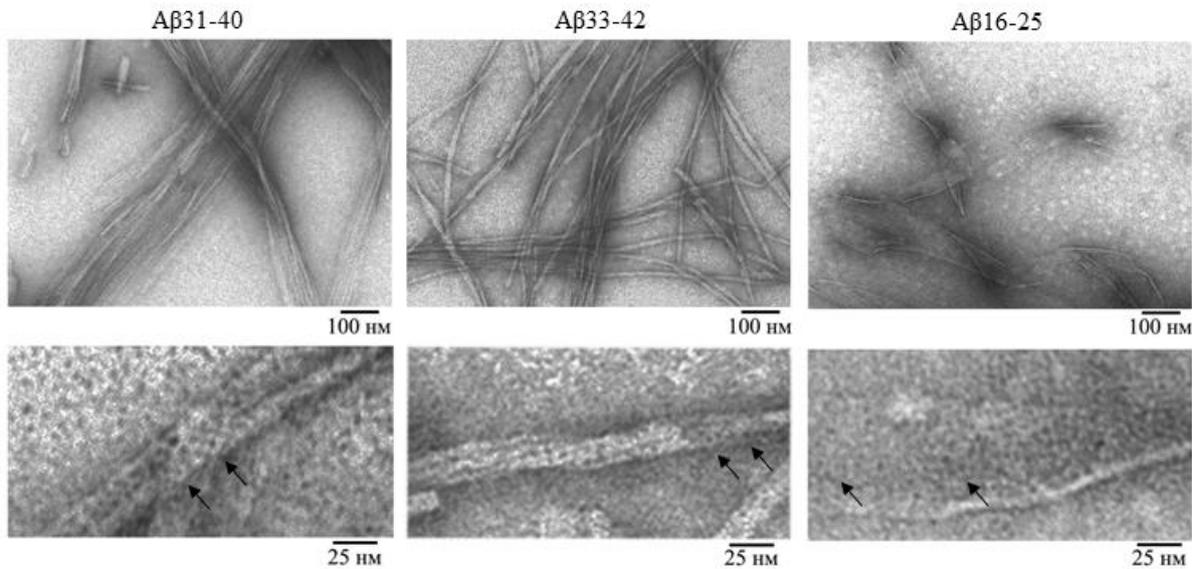


Рисунок 1 – Электронно-микроскопические изображения фрагментов A $\beta$ 1-42 пептида. Верхняя панель – поля фрагментов A $\beta$ 1-42 пептида, нижняя – фрагменты полей с большим увеличением. Стрелками обозначены кольцевые олигомеры. Все эксперименты проводили при концентрациях препаратов 0,25-0,5 мг/мл в условиях 5 % DMSO, 50 mM Трис-НСl (рН 7,5) и инкубации при 37°C (24 часа). Негативное контрастирование 1 %-ым водным раствором уранилацетата

Согласно данным рентгеноструктурного анализа все три пептида показывают характерные рефлексы для кросс- $\beta$  структуры: экваториальный 8-12 Å и меридиональный 4,5-4,8 Å, что характерно для амилоидных фибрилл (см. рис. 2).

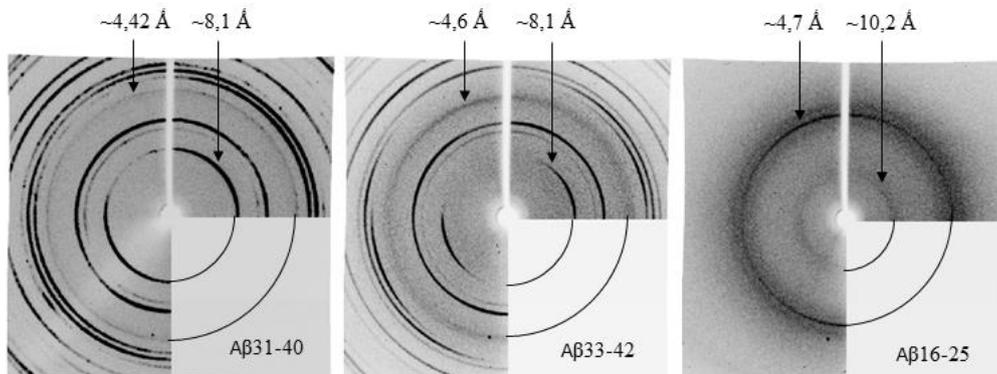


Рисунок 2 – Рентгенограммы фрагментов A $\beta$ 1-42 пептида. Все препараты готовили в условиях 5 % DMSO, 50 mM Трис-НСl (рН 7,5) после 24 часов инкубации при 37°C. Концентрировали препараты центрифугирование при 12 тыс об/мин до 5 мг/мл. Подготовка препаратов к рентгеноструктурному анализу согласно [5]

Следует отметить, что для пептидов A $\beta$ 31-40 и A $\beta$ 33-42 наблюдается большое количество дополнительных рефлексов. Дополнительные рефлексы для амилоидных фибрилл отмечают для многих амилоидных фибрилл [6] в том числе и для целых A $\beta$ 1-40 и A $\beta$ 1-42 пептидов [7]. Кросс- $\beta$  структура предполагает, что фибрилла построена из  $\beta$ -листов, проходящих параллельно вдоль всей оси фибриллы и расположенных на расстоянии 8-12 нм друг от друга. При этом  $\beta$ -листы организованы из  $\beta$ -тяжей, идущих перпендикулярно оси фибриллы и расположенных на расстоянии 4,5-4,8 Å друг от друга. Однако, как тогда объяснить наличие характерных рефлексов для пептида A $\beta$ 16-25? Напрашивается вывод, что может быть и другая организация фибрилл.

Ранее ряд авторов еще в 1980-тые 1990-тые годы обращали внимание на наличие дополнительных рефлексов и пытались их интерпретировать [8]. Однако, интерпретация рентгеновских данных проводилась с учетом устоявшегося представления о структурной организации амилоидных фибрилл. К 1980-м годам сложилось общее представление о том, что фибриллы построены из филаментов (от 2-х до 6), которые взаимодействуют друг с другом латерально, могут перекручиваться с разным периодом, формировать ленты, пучки, кластеры. Филаменты представляют собой  $\beta$ -листы, проходящие вдоль всей оси фибриллы. Такое представление идет от 1935 г. [9], когда исследовались рентгеноструктурные данные от фибрилл фибриллярных белков (фиброин,  $\beta$ -кератин,  $\beta$ -миозин) и частично денатурированного глобулярного белка альбумина. Для этих объектов были получены схожие картины дифракции

рентгеновских лучей с характерными рефлексами (4,65 и 9,8 Å). С этого времени стали интерпретировать структурную организацию фибриллярных образований, как складчатые листы (“pleated sheet”). Впервые термин кросс-β структура появился в 1968 г. [10] и с тех пор остается основным представлением для объяснения структуры амилоидных структур. С началом использования электронного микроскопа для изучения биологических объектов в 1950-е – 1960-е годы стали появляться работы по изучению срезов поврежденных амилоидозами тканей (печень, почки, селезенка) [11], а затем и экстрактов из этих же тканей [12]. Несмотря на то, что часть авторов, уже тогда наблюдала кольцевые олигомерные структуры [13], все равно основная интерпретация ЭМ снимков предполагала, что кольцевой олигомер представляет собой продольный срез фибриллы. Нам представляется, что так легче было согласовать существовавшие на тот момент данные рентгеноструктурного и ЭМ анализов.

В последнее время, однако, появляются работы, которые предлагают и другие модели формирования фибрилл. Например в работе [14] при изучении с помощью метода ЭМ процесса формирования фибрилл Aβ1-42 пептидом фибриллы формируются из олигомеров. А в работе [15], при изучении фибриллообразования α-синуклеина предлагается гранулярный механизм формирования фибрилл (“a double-concerted fibrillation model”), при котором мономеры формируют гранулы, а затем гранулы ассоциируют в фибриллы. В обоих случаях диаметр олигомеров и гранул совпадает с диаметром самых тонких фибрилл.

Олигомеры являются неизменными участниками процесса формирования зрелых фибрилл. Они отмечаются на начальном этапе их формирования и исчезают при созревании фибрилл. Показано, что именно олигомерные образцы (от димеров до более крупных агрегатов) являются наиболее токсичными для клеток [16]. Рядом авторов отмечается наличие кольцевых олигомеров и высказывается предположение, что такие олигомеры могут встраиваться в клеточную мембрану и формировать поры (annular pores), что может приводить к гибели клеток [17]. Следует отметить, что наличие депозитов амилоидных фибрилл при БА не всегда связано с заболеванием. Т.е., все больше данных, свидетельствующих о том, что именно олигомеры представляют опасность при БА и именно их формирование следует предотвращать.

Так куда же пропадают олигомерные агрегаты? Мы предполагаем, что именно кольцевые олигомеры являются основными строительными блоками для построения фибрилл. Именно такая структурная организация может легче объяснить характерный для амилоидных фибрилл полиморфизм, их дробление, ветвление и т.д.

Принимая за строительный блок кольцевой олигомер, который согласно данным ЭМ анализа, представляет собой короткий полый цилиндр с наружным диаметром 6-7 нм, внутренним – 2-3 нм и высотой около 3 нм, и применив структурное моделирование, можно предположить, что кольцевой олигомер состоит из 48 молекул пептида, которые формируют 12 β-листов, уложенных по кругу. Внешний диаметр такого круга около 6 нм, внутренний около 2 нм. Такая организация кольцевого олигомера вполне может при ассоциации в фибриллу дать достаточное количество β-листов и β-тяжей, чтобы при рентгеноструктурном анализе были получены соответствующие картины дифракции для кросс-β структуры. Надо отметить, что в недавних работах уделяется особое внимание именно интермедиатам на пути формирования фибрилл, в частности, додекамерам, которые взаимодействуют друг с другом с образованием фибрилл.

Нам представляется, что модель формирования фибрилл из кольцевых олигомеров, которые различным образом взаимодействуют друг с другом (кольцо-к-кольцу, кольцо-на-кольцо с некоторым сдвигом и т.д.), может лучше объяснить многие присущие амилоидам свойства, такие как сильный полиморфизм в одних и тех же условиях дробление, ветвление. При этом молекулярная структура кольцевого олигомера может иметь различия для разных коротких белков/пептидов (см. рис.3).

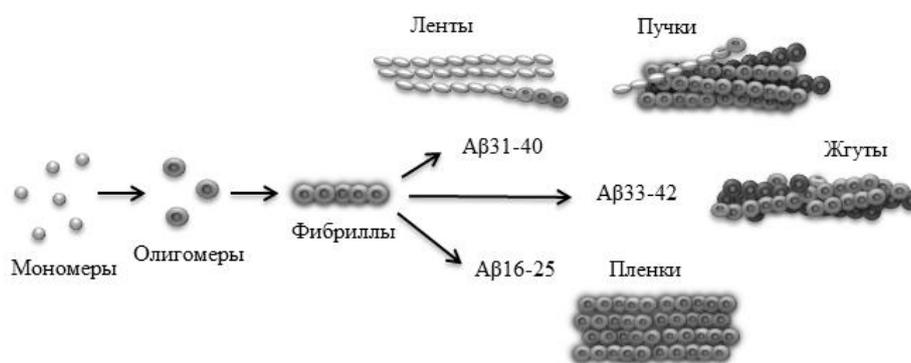


Рисунок 3 – Схематическое изображение модели формирования фибрилл из кольцевых олигомеров

Правильное представление о механизме формирования амилоидных фибрилл и их молекулярной организации является необходимым условием для разработки правильной стратегии при разработке терапевтических средств, способных предотвратить агрегацию амилоидных белков. При этом становится понятным, что не сами фибриллы, а именно олигомерные интермедиаты представляют наибольшую опасность для человека. Тогда напрашивается вывод, что необходим поиск агентов/молекул, которые будут противодействовать образованию олигомеров, которые являются началом всего патологического пути при развитии БА.

**Список литературы / References:**

1. Сури́н А.К., Григорашвили Е.И., Суворина М.Ю., Селиванова О.М., Галзитская О.В. Определение участков пептида A $\beta$ (1-40), вовлеченных в образование амилоидных фибрилл. *Биохимия (Москва)*, 2016, т. 81, с. 999-1007. [Surin A.K., Grigorashvili E.I., Suvorina M.Yu., Selivanova O.M., Galzitskaya O.V. Determination of regions involved in amyloid fibril formation for A $\beta$ (1-40) peptide. *Biochemistry (Moscow)*, 2016, vol. 81, pp. 762-769 (in Rus.)]
2. Suvorina M.Yu, Selivanova O.M, Grigorashvili E.I., Nikulin A.D, Marchenkov V.V., Surin A.K., Galzitskaya O.V. Studies of Polymorphism of Amyloid- $\beta$ 42Peptide from Different Suppliers. *J. Alzheimer's Dis.*, 2015, vol. 47, pp. 583-593.
3. Garbuzynskiy S.O., Lobanov M.Y., Galzitskaya O.V. FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence. *Bioinformatics*, 2010, vol. 26, pp.326-332.
4. Selivanova O.M., Surin A.K., Marchenkov V.V., Dzhus U.F., Grigorashvili E.I., Suvorina M.Yu., Glyakina A.V., Dovidchenko N.V., Galzitskaya O.V. The mechanism underlying amyloid polymorphism is opened for alzheimer's disease amyloid- $\beta$  peptide. *J. Alzheimer Dis.*, 2016, vol. 54, pp. 821-830.
5. Makin O.S., Serpell L.C. X-ray diffraction studies of amyloid structure. *Methods Mol. Biol.*, 2005, vol. 299, pp. 67-80.
6. Malinchik S.B., Inouye H., Szumowski K.E., Kirschner D.A. Structural Analysis of Alzheimer's  $\beta$ (1-40) Amyloid: Protofilament Assembly of Tubular Fibrils. *Biophysical J.*, 1998, vol., pp. 537-545.
7. Selivanova O.M., Grigorashvili E.I., Suvirina M.Yu., Dzhus U.F., Nikulin A.D., Marchenkov V.V., Surin A.K., Glyakina A.V., Galzitskaya O.V. X-ray diffraction and electron microscopy data for amyloid formation of A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42. *Data in Brief*, 2016, vol. 8, pp. 108-113.
8. Inouye H., Fraser P.E., Kirschner D.A. Structure of a $\beta$ -crystallite assemblies formed by Alzheimer  $\beta$ -amyloid protein analogues: analysis by x-ray diffraction. *Biophysical J.*, 1993, vol. 64, pp. 502-519.
9. Astbury W.T., Dickinson S., Bailey K. The X-ray interpretation of denaturation and the structure of the seed globulins. *Biochem J.*, 1935, vol. 29, pp. 2351-2360.
10. Eanes E.D., Glenner G.G. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *Histochem. Cytochem.*, 1968, vol. 16, pp. 673-677.
11. Cohen A.S., Calkins E. Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature*, 1959, vol. 183, pp. 1202-1203.
12. Shirahama T., Cohen A.S. High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril. *J. Cell. Biol.*, 1967, vol. 33, pp. 679-708.
13. Benditt E.P., Eriksen N. Amyloid, III. A protein related to the subunit structure of human amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1967, vol. 55, pp. 308-316.
14. Nielsen E.H., Nybo M., Svehag S.-E. Electron microscopy of prefibrillar structures and amyloid fibrils. *Methods Enzymol.*, 1999, vol. 309, pp. 491-496.
15. Bhak G., Lee G.-H., Hahn G.-S., Paik S.R. Granular Assembly of  $\alpha$ -Synuclein Leading to the Accelerated Amyloid Fibril Formation with Shear Stress. *PLoS ONE*, 2009, vol. 4, e4177.
16. Shankar G.M., Li S., Mehta T.H., Garcia-Munoz A., Shepardson N., Smith I., Brett F.M., Farrell M.A., Rowan M.J., Lemere C.A., Regan C.M., Walsh D.M., Sabatini B.L., Selkoe D.J. Amyloid- $\beta$  protein dimers isolated directly from alzheimer' brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine*, 2008, vol. 14, pp. 837-842.
17. Quist A., Doudevski I., Lin H., Azimova R., Ng D., Frangione B., Kagan B., Ghiso J., Lal R. Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005, vol. 102, pp. 10427-10432.