

# Применение суперкомпьютерных расчетов в исследовании молекулярного механизма цинк-зависимой агрегации белка бета-амилоида при развитии болезни Альцгеймера

**А.Б. Манцызов**<sup>1</sup>, С.А. Козин<sup>2</sup>, А.А. Макаров<sup>2</sup>, В.И. Польшаков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> – Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН



05.03.2018



# Болезнь Альцгеймера (БА)

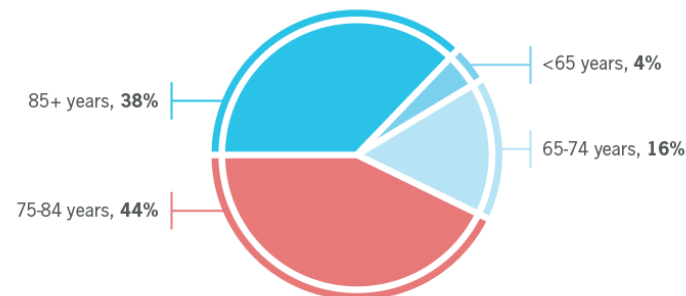
Нейродегенеративное заболевание

Манифестация:

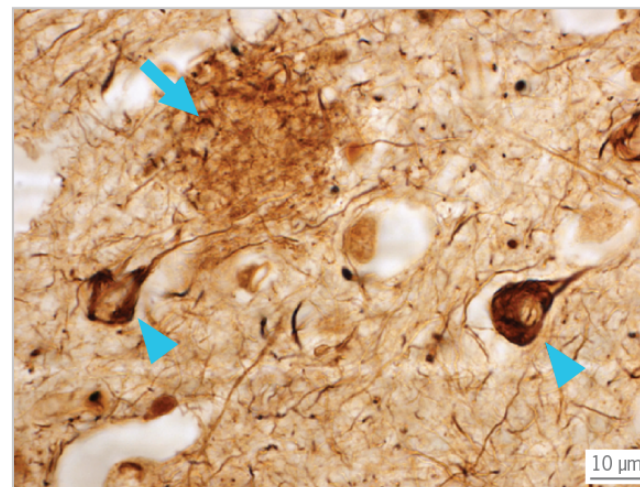
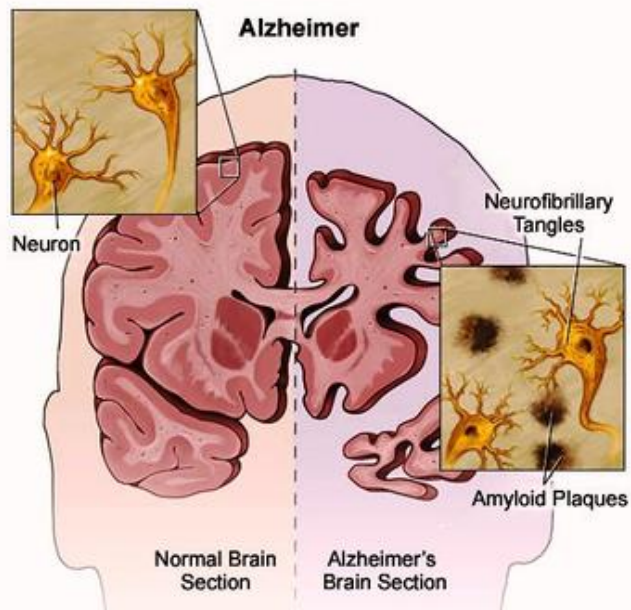
прогрессивное ухудшение когнитивных способностей

Гистопатоморфологические признаки:

образование амилоидных бляшек в головном мозгу,  
гибель нейронов



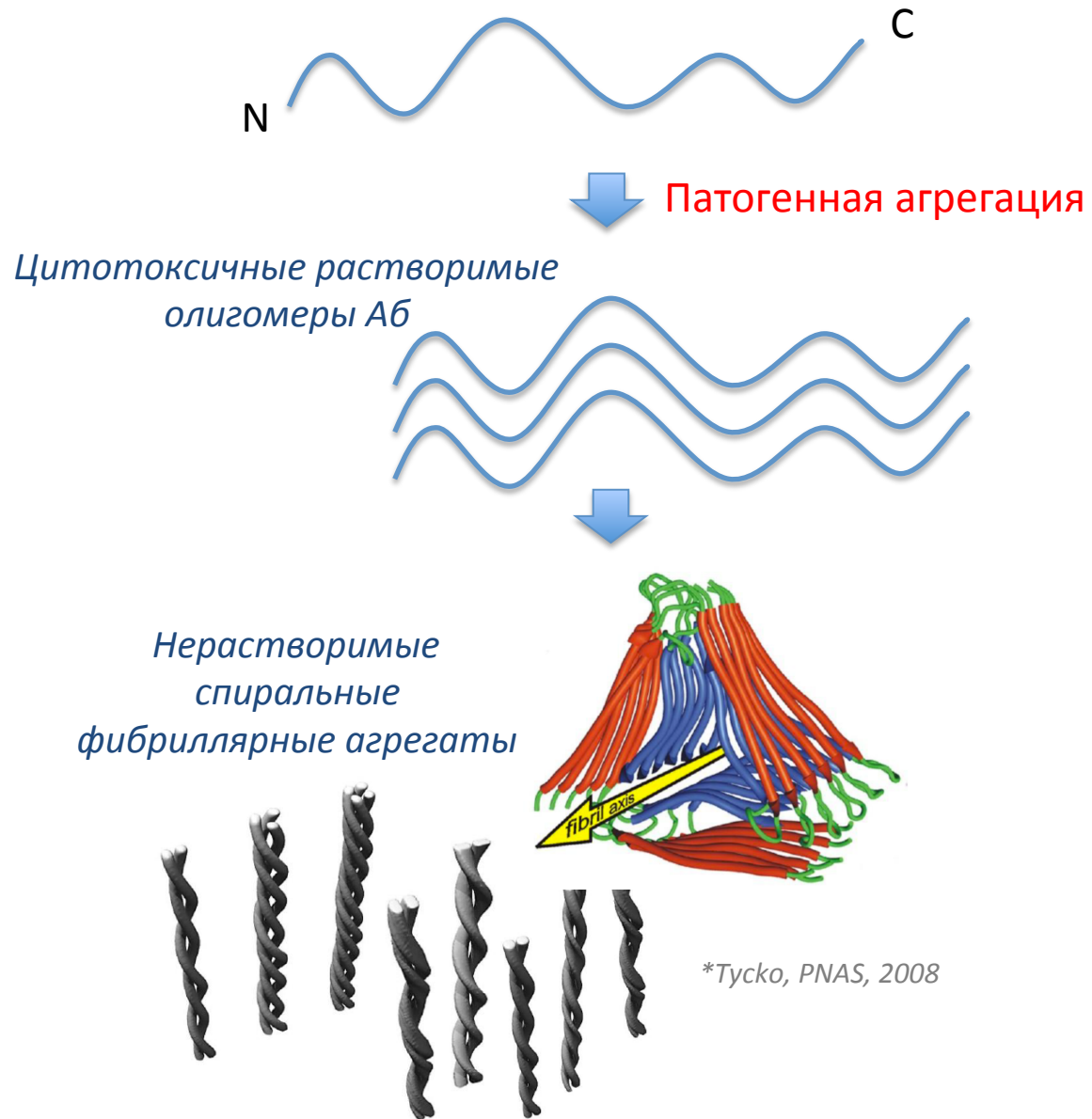
Source: Modified from Alzheimer's Association. Alzheimer's Association Report: 2017 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's & Dementia 2017;1:50.



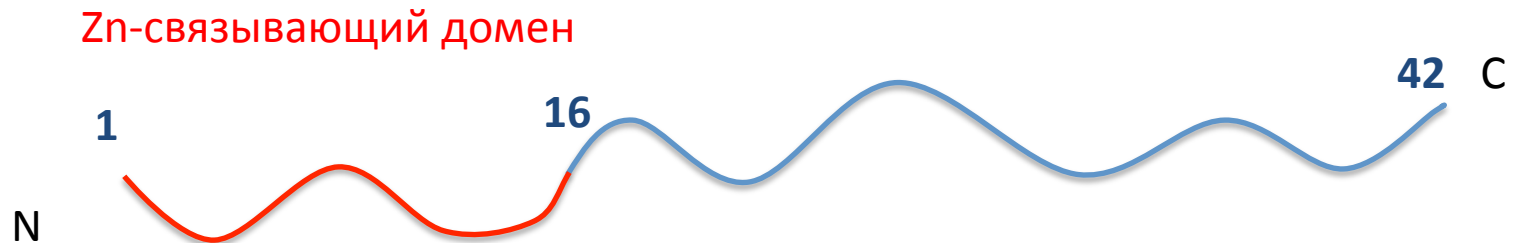
Source: Modified from Winblad B, et al. Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. Lancet Neurology 2016;15:455-532.

# Болезнь Альцгеймера: молекулярный механизм

- Причины возникновения неизвестны
- Амилоидная гипотеза
- Белок бета-амилоид (Аб) – основной компонент амилоидных бляшек



# Бета-амилоид

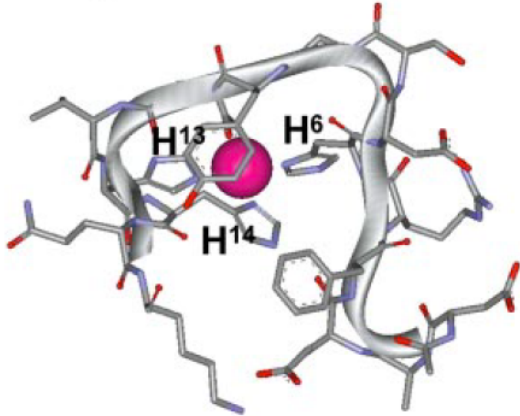


- Нормальный 40 а.о., патогенный 42 а.о.
- Неструктурированный белок\*
- Высокая концентрация цинка в амилоидных бляшках\*\*

=> Взаимодействие с цинком может служить индуктором агрегации

# Бета-амилоид: цинк-связывающий домен

## А6 1-16



Человеческий пептид образует мономеры при хелатировании цинка, которые способны олигомеризоваться\*

Ряд мутация в области цинк-связывающего домена, ассоциированные с развитием БА

**H6R - английская,**  
**D7H - тайваньская,**  
**D7iso**

Крысиный пептид: отличается от человеческого 3 заменами

Крысы не страдают БА

Все замены в области 1-16

|       | 5                           | 10             | 15           | 20  | 25         | 30 | 35  | 40         |    |   |          |    |
|-------|-----------------------------|----------------|--------------|-----|------------|----|-----|------------|----|---|----------|----|
| Human | DAE <b>F</b> RHDSG <b>Y</b> | EV <b>H</b> HQ | KL           | VFF | AEDVGSNKGA | I  | I   | GLMVGGVV   | IA |   |          |    |
| Rat   | DAE <b>F</b> G              | HDSG <b>F</b>  | E <b>V</b> R | H   | HQ         | KL | VFF | AEDVGSNKGA | I  | I | GLMVGGVV | IA |

## Постановка задачи

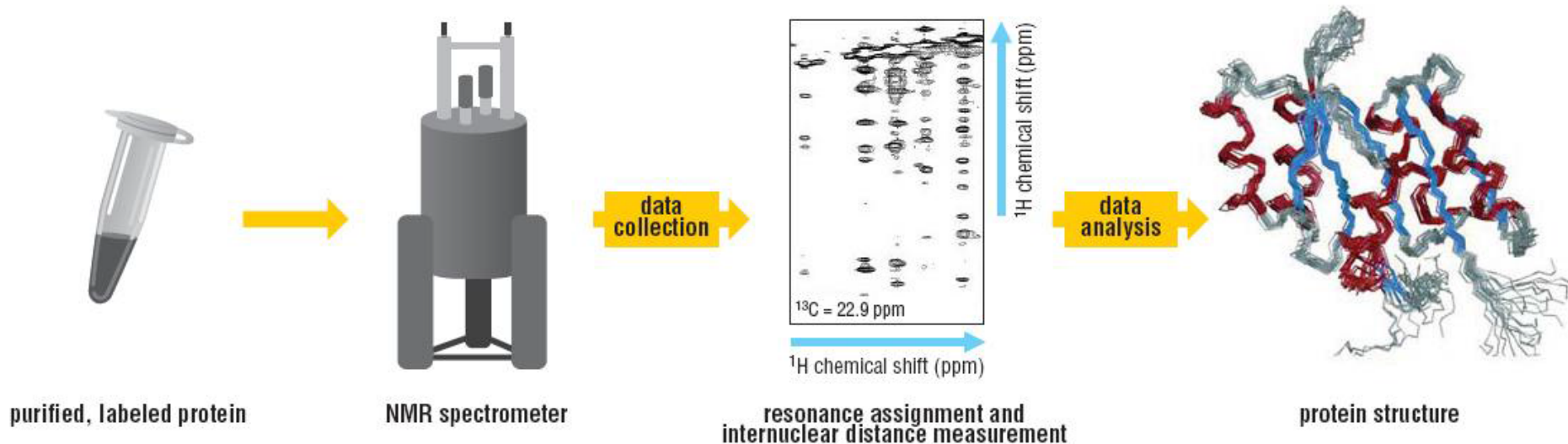
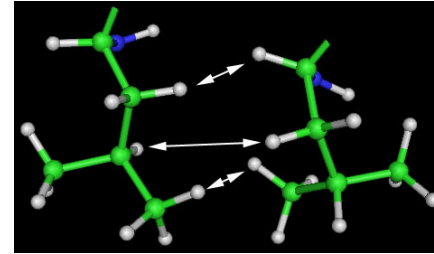
- Добавление ионов цинка индуцирует агрегацию Аб
- Блокирование цинк-связывающего домена может предотвратить агрегацию Аб

=> Исследование структурных аспектов цинк-зависимой агрегации различных форм Аб1-16

Методы: ЯМР спектроскопия и молекулярное моделирование,

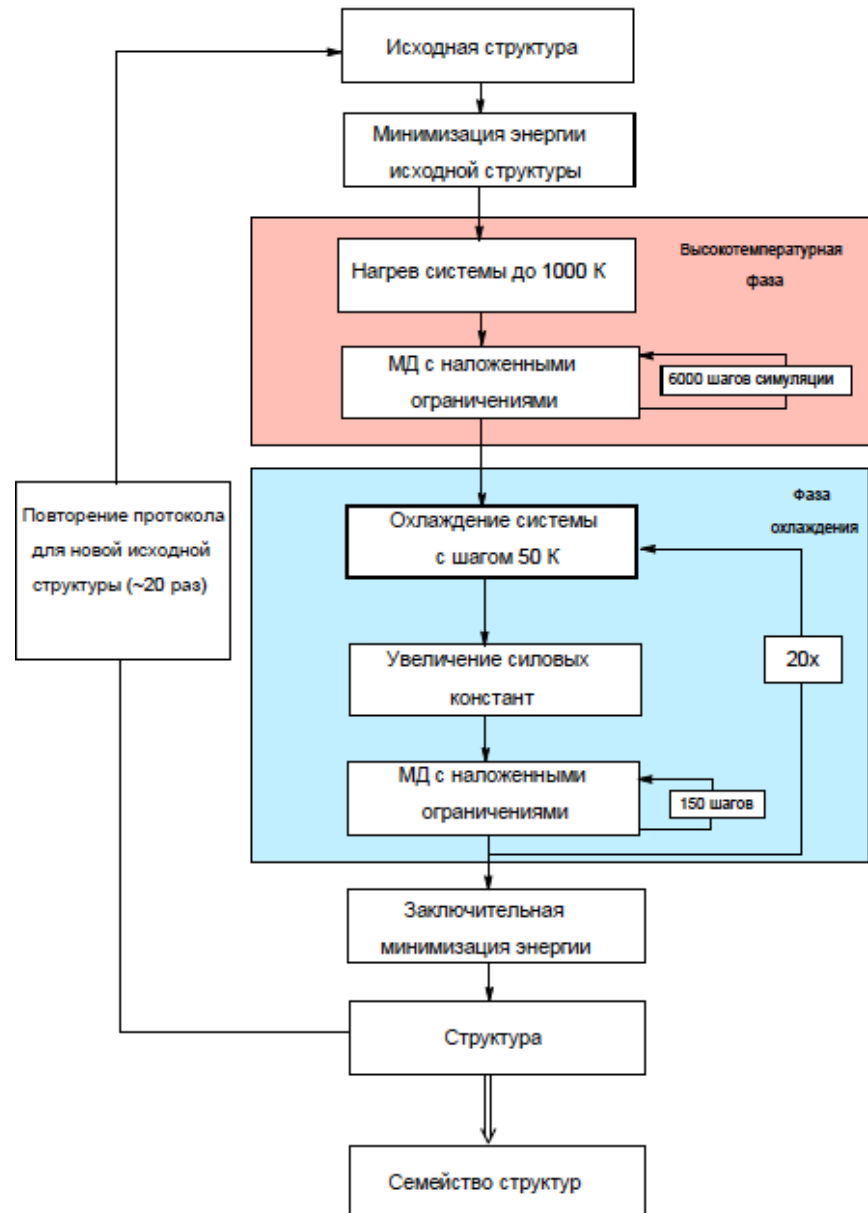
# Определение структуры белка методом спектроскопии ЯМР в растворе

- Отнесение сигналов в спектрах
- Определение пространственных ограничений
- Расчет структуры



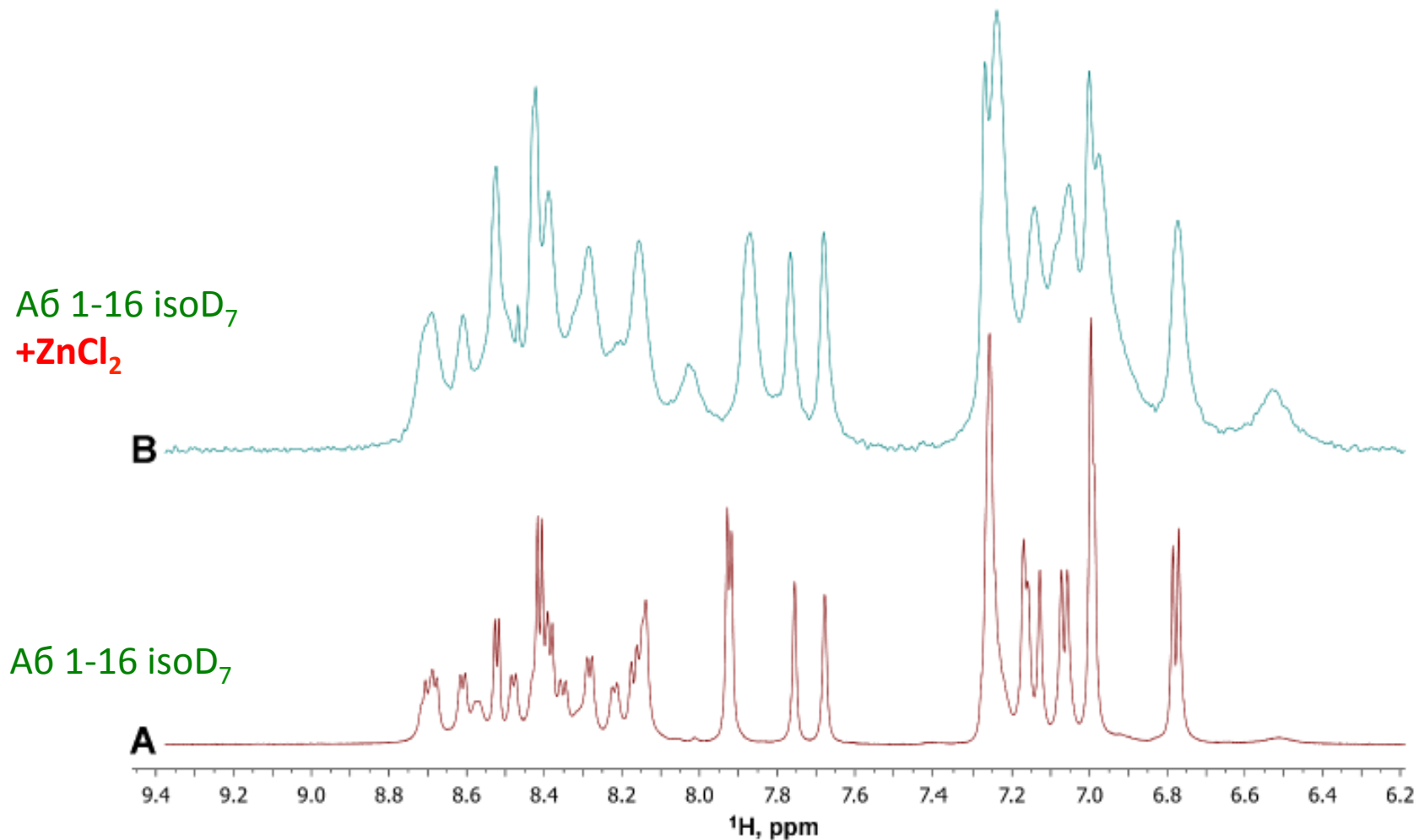
# Определение структуры белка методом ЯМР

- Метод моделированного отжига
- Экспериментально полученные пространственные ограничения
- Расчет траектории МД с применением потенциала для экспериментальных ограничений
- Обычно в вакууме без потенциала электростатических взаимодействий, может проводиться финальная утряска в растворителе





# Конформационное уширение пиков в спектрах ЯМР в присутствии $Zn^{2+}$



# Разработка протокола расчета структур по ограничениям ЯМР с использованием растворителя в явном виде

Т пептида 1500 -> 600 К  
Т растворителя 600 К  
Шаг dT 100 К  
Скорость V(dT) 100 К/пс  
Термостатирование 1 пс  
Вес ограничений 0 -> 1000

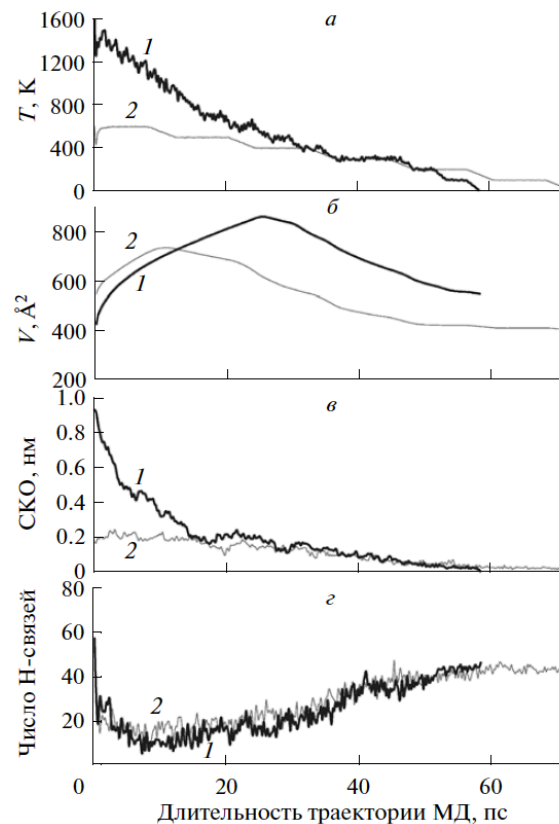
Т системы 600 -> 0 К  
Шаг dT 100 К  
Скорость V(dT) 50 К/пс  
Термостатирование до 300К 3 пс,  
10пс при 300К  
Вес ограничений 0 -> 4000

Нагрев до 600 К  
8 пс термостатирование

Т системы 600 -> 0 К  
Шаг dT 100 К  
Скорость V 25 К/пс  
Термостатирование 8 пс  
Вес ограничений 4000

58 пс

84 пс



- Использование растворителя в явном виде с первого шага отжига позволяет получить структуры более высокого качества
- Gromacs, SPC/E, AMBER-03
- 20 структур, 320 процессоров, 16 мин
- СК СКИФ

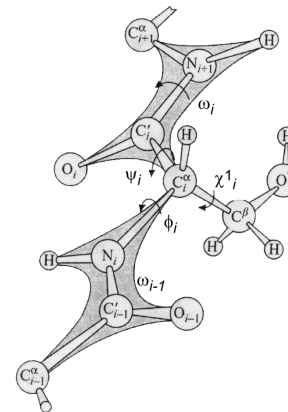
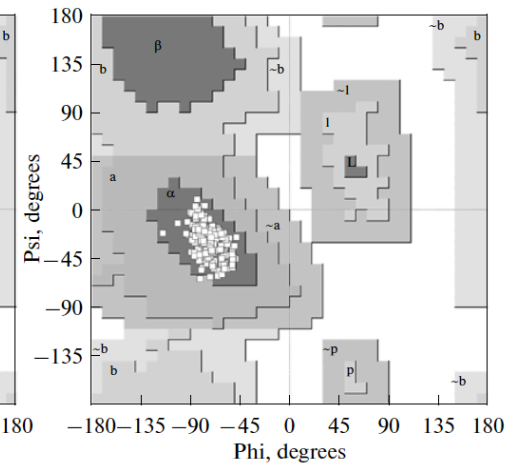
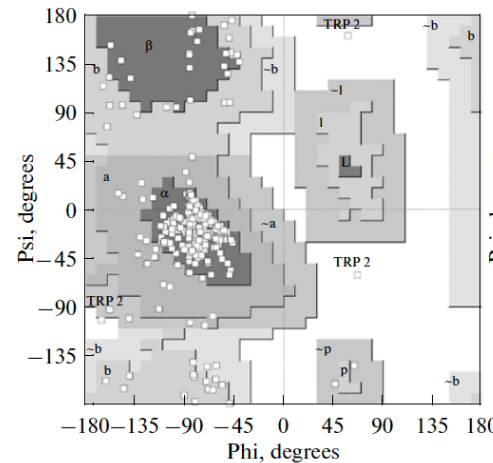
Стандартный протокол  
(расчет в вакууме)

Новый протокол  
(расчет в растворителе)

Стандартный протокол  
(расчет в вакууме)

Новый протокол  
(расчет в растворителе)

PDB 1D9L

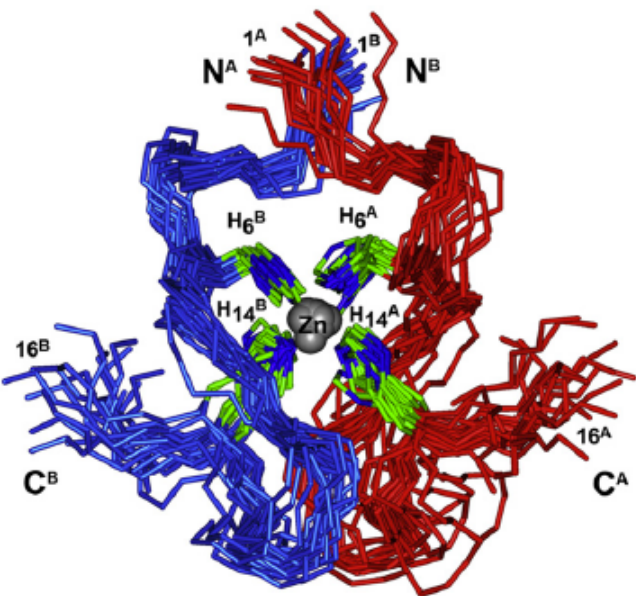


| Статистика рассчитанных структур  | Семейство 1D9L | Gromacs, протокол 18 |
|---|----------------|----------------------|
| Нарушение ограничений на расстояния, Å  | 0.066          | 0.096                |
| Процент аминокислотных остатков в наиболее благоприятной области карты Рамачандрана | 80.3           | 97.6                 |
| Процент аминокислотных остатков в запрещенной области карты Рамачандрана            | 0.9            | 0.0                  |
| СКО координаттяжелых атомов белковой цепи (C', C <sub>α</sub> , O и N)*             | 2.52 ± 0.56    | 0.99 ± 0.06          |

\*MolBiol (Msc), Istrate et. al. 2010

# Расчет ЯМР структур Zn-связывающего домена А6

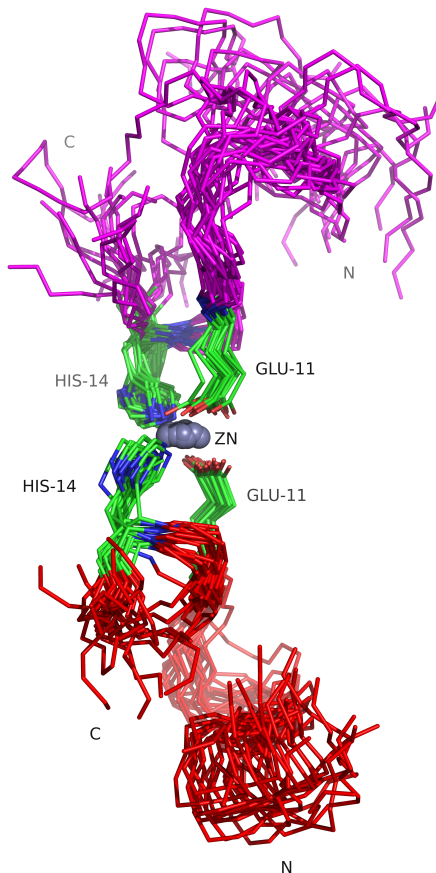
А6 1-16 крысы



PDB code: 2LI9

Biophysical J.  
Istrate et al. 2012

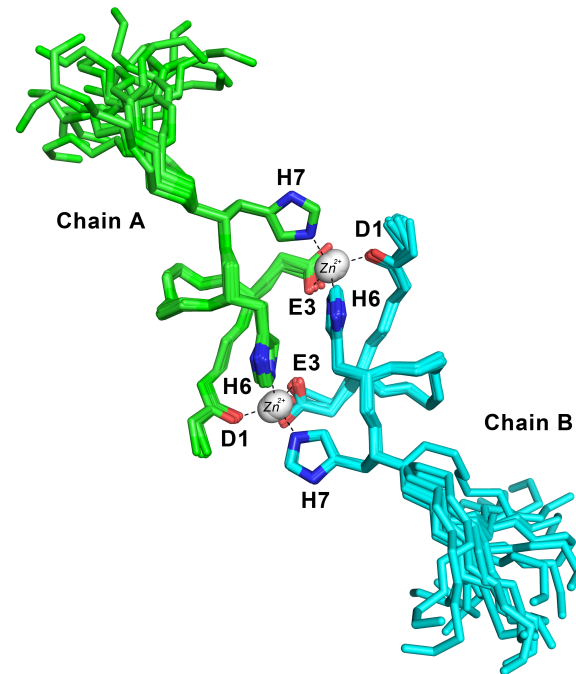
А6 1-16 человека  
мутант Н6R



2MGT

Scientific Reports  
Istrate et al. 2016

А6 1-10 человека  
мутант D7H

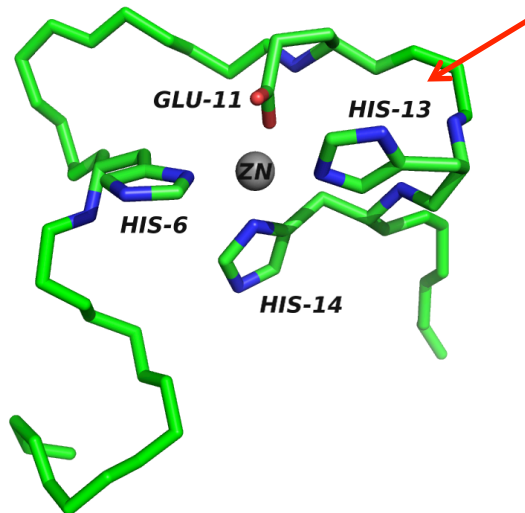
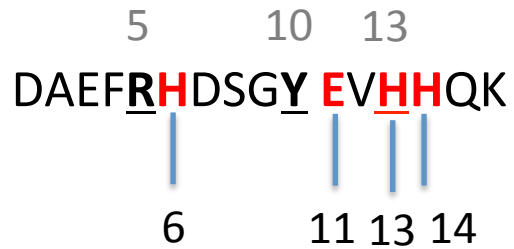


5LFY

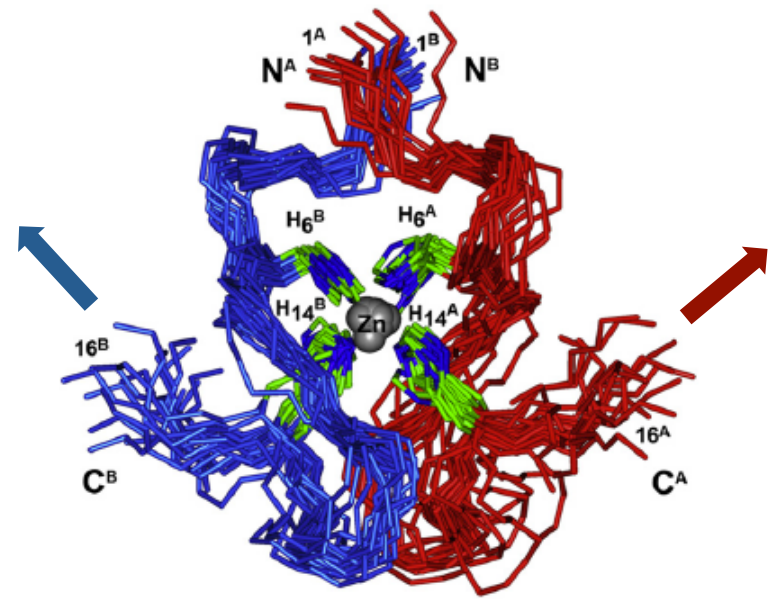
Angewandte Chemie  
Polshakov et al. 2017

# Сравнение Zn-связывающего домена Аб крысы и человека

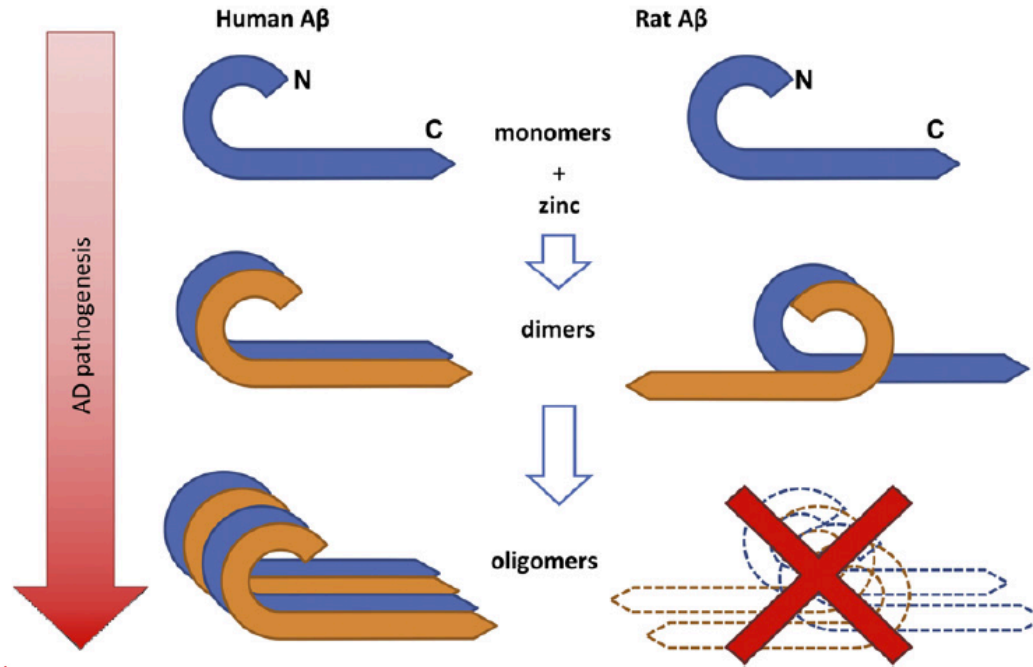
Аб 1-16 человека



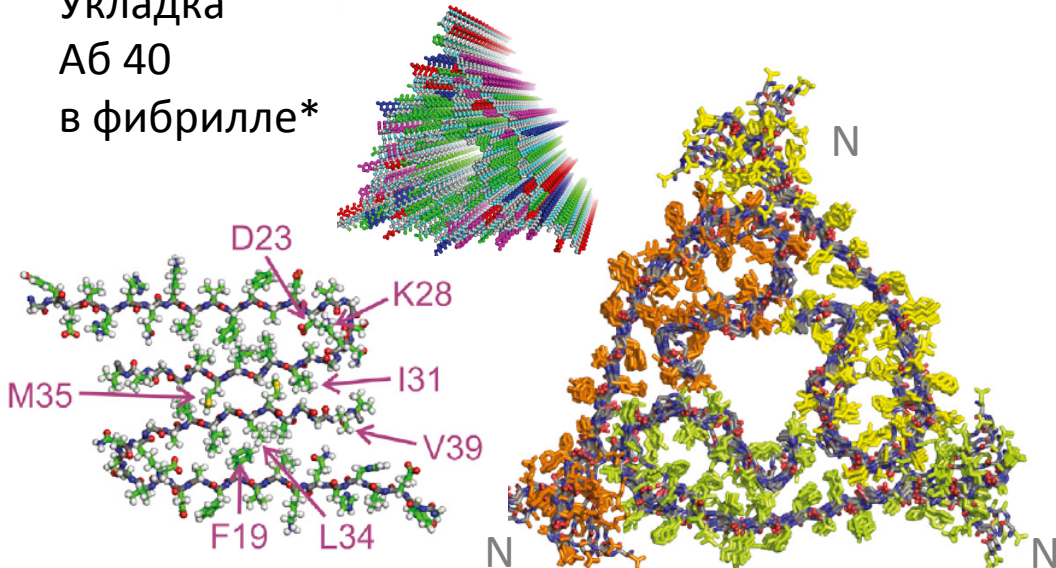
Аб 1-16 крысы



# Агрегация Zn-связывающего домена Аβ крысы и человека

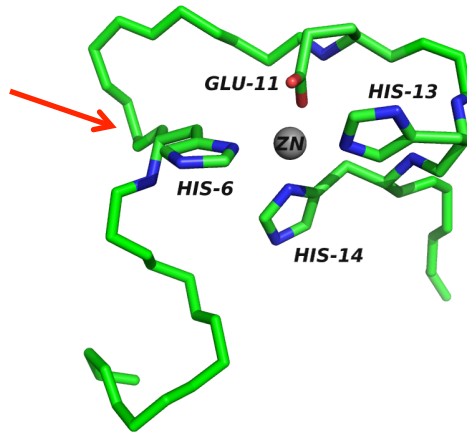


Укладка  
Аβ 40  
в фибрилле\*

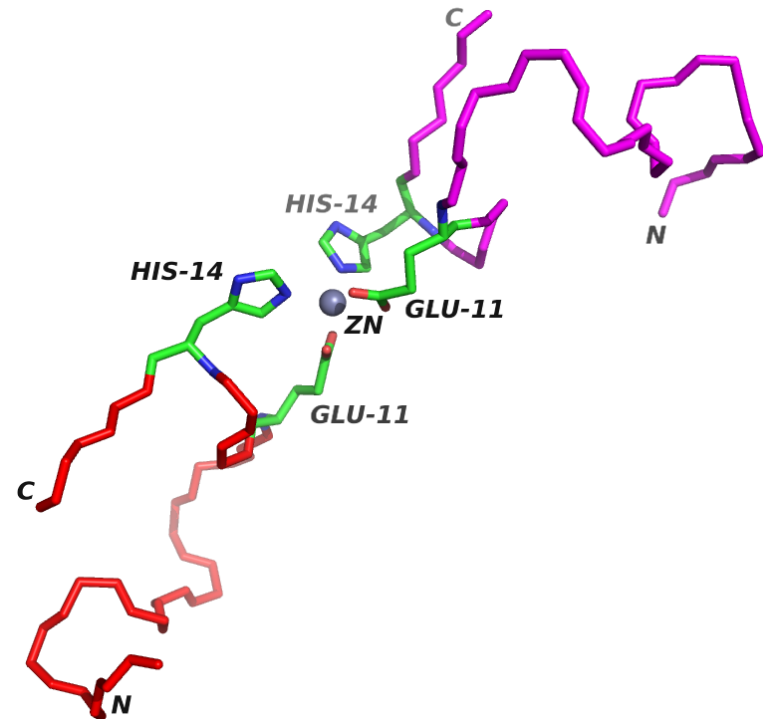


# Zn-связывающий домен Аб человека

Аб 1-16 человека



Аб 1-16 человека  
Мутант H6R



# Zn-связывающий домен Aβ человека

Исследованные пептиды:

|                               | 1         | 5                  | 10          | 15  |               |         |
|-------------------------------|-----------|--------------------|-------------|-----|---------------|---------|
| Aβ <sub>1-16</sub>            | D A E F R | H D S              | G Y E V H H | Q K | Агрегирует    |         |
| H6R-Aβ <sub>1-16</sub>        | D A E F R | R D S              | G Y E V H H | Q K | Не агрегирует | Димер   |
| isoD7-Aβ <sub>1-16</sub>      | D A E F R | H <sup>i</sup> D S | G Y E V H H | Q K | Агрегирует    |         |
| Aβ <sub>6-16</sub>            |           | H D S              | G Y E V H H | Q K | Агрегирует    |         |
| isoD7-H13R-Aβ <sub>1-16</sub> | D A E F R | H <sup>i</sup> D S | G Y E V R H | Q K | Не агрегирует | Мономер |
| isoD7-Aβ <sub>1-10</sub>      | D A E F R | H <sup>i</sup> D S | G Y         |     | Не агрегирует | Мономер |

| Peptides                      | Zinc binding                                       |                |                   | C, mM | DLS                       | Turbidity <sup>c</sup> OD <sub>350</sub> × 10 <sup>2</sup> /OD <sub>405</sub> × 10 <sup>2</sup> |                             |
|-------------------------------|--|----------------|-------------------|-------|---------------------------|---|-----------------------------|
|                               | K <sub>a</sub> × 10 <sup>4</sup> , M <sup>-1</sup> | N <sup>a</sup> | Ref               |       | Diameter, nm <sup>b</sup> | Free peptide  | Peptide + ZnCl <sub>2</sub> |
| Aβ <sub>1-16</sub>            | 1.70 ± 0.40  | 1.0            | ITC <sup>43</sup> | 0.2   | 0                         | 2.2 ± 1.3/2.2 ± 1.8   | 3.0 ± 1.7/1.8 ± 0.9         |
|                               |  |                |                   | 5.0   | 2.5 ± 0.3                 | 9.4 ± 1.7/5.4 ± 1.1   | 44 ± 10/38 ± 10             |
| H6R-Aβ <sub>1-16</sub>        | 0.24 ± 0.03  | 0.5            | ITC <sup>36</sup> | 1.0   | 0                         | 1.5 ± 0.6/1.7 ± 0.9   | 2.0 ± 1.2/1.9 ± 1.3         |
| isoD7-Aβ <sub>1-16</sub>      | 1.30 ± 0.40  | 1.0            | ITC <sup>43</sup> | 0.8   | 2.7 ± 0.3                 | 2.4 ± 1.1/2.4 ± 1.1   | 491 ± 232/454 ± 219         |
| Aβ <sub>6-16</sub>            | 1.27 ± 0.13  | 1.0            | this work, ITC    | 2.0   | 17 ± 6                    | 2.0 ± 0.8/2.2 ± 0.8   | 422 ± 20/278 ± 11           |
| isoD7-H13R-Aβ <sub>1-16</sub> | 0.14 ± 0.01  | 1.0            | this work, NMR    | 1.0   | 0                         | 1.7 ± 1.1/1.4 ± 1.0   | 2.0 ± 1.3/2.0 ± 1.1         |
| isoD7-Aβ <sub>1-10</sub>      | 0.12 ± 0.01  | 1.0            | this work, NMR    | 1.0   | 0                         | 2.6 ± 1.4/2.5 ± 1.1   | 2.8 ± 1.7/2.8 ± 1.3         |



## Zn-связывающий домен Аб человека: 2 сайта олигомеризации

Сайт 1:

11 14

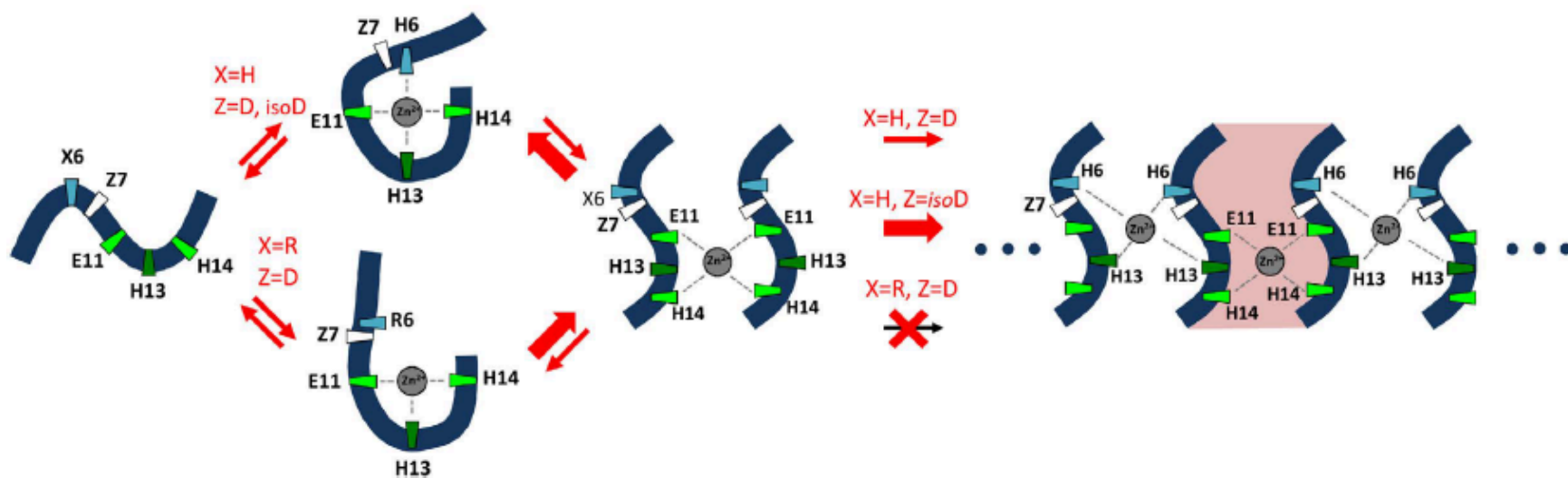
DAEFR**H**DSGY **E**V**H****H**QK

Сайт 2:

6

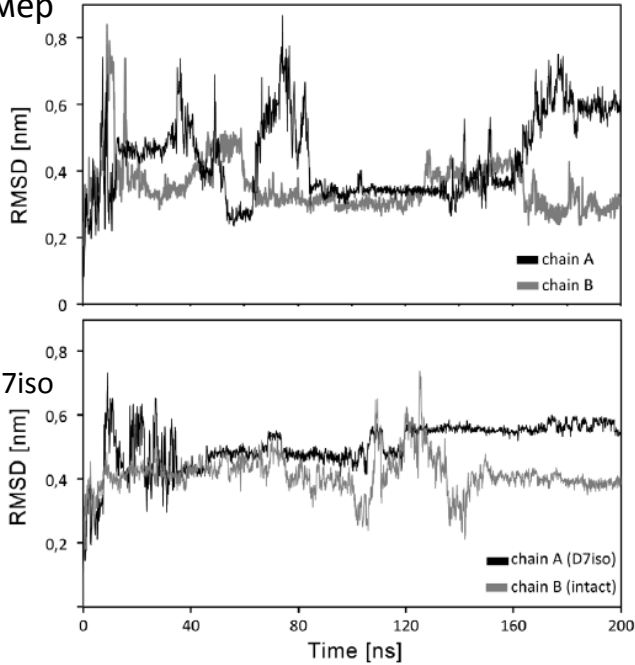
13

# Механизм Zn-зависимой олигомеризации Аβ 1-16 человека

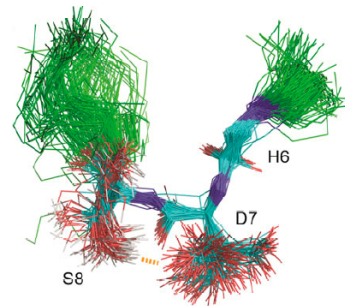
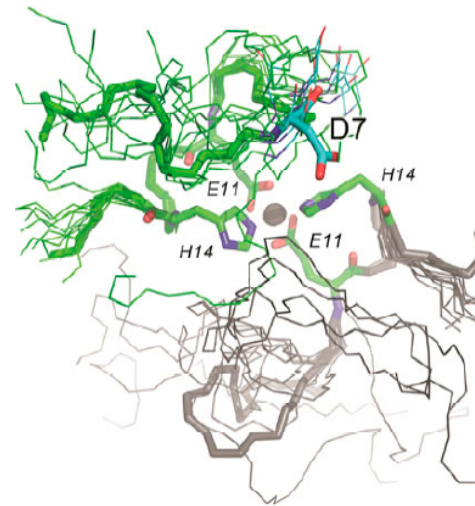


# Zn-связывающий домен А6 человека: влияние изомеризации D7 на подвижность N-концевого участка в димере

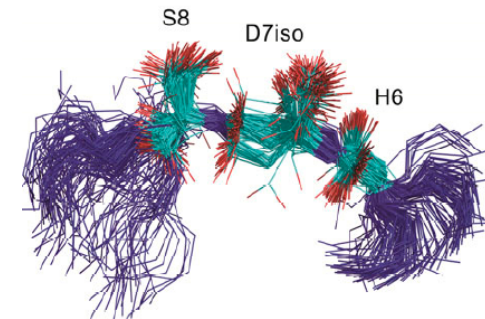
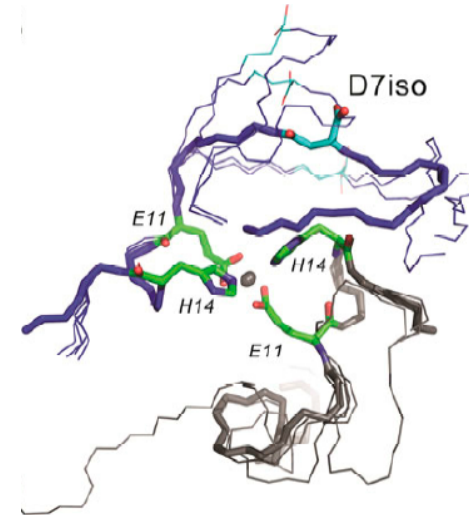
А6 1-16  
гомономер



А6 1-16 гомодимер

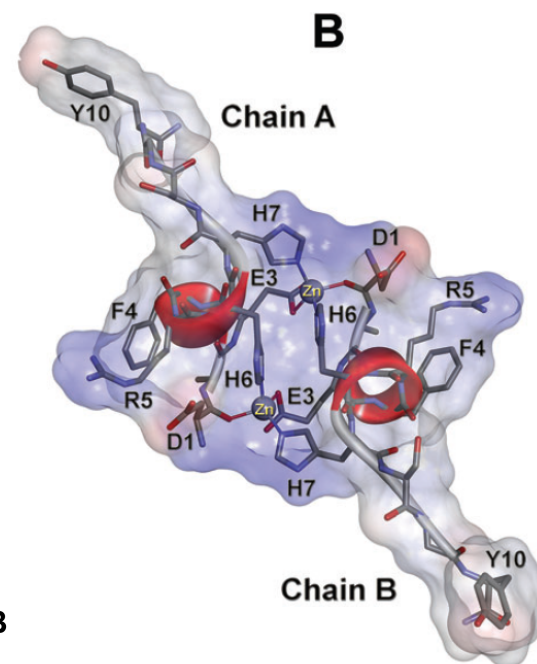
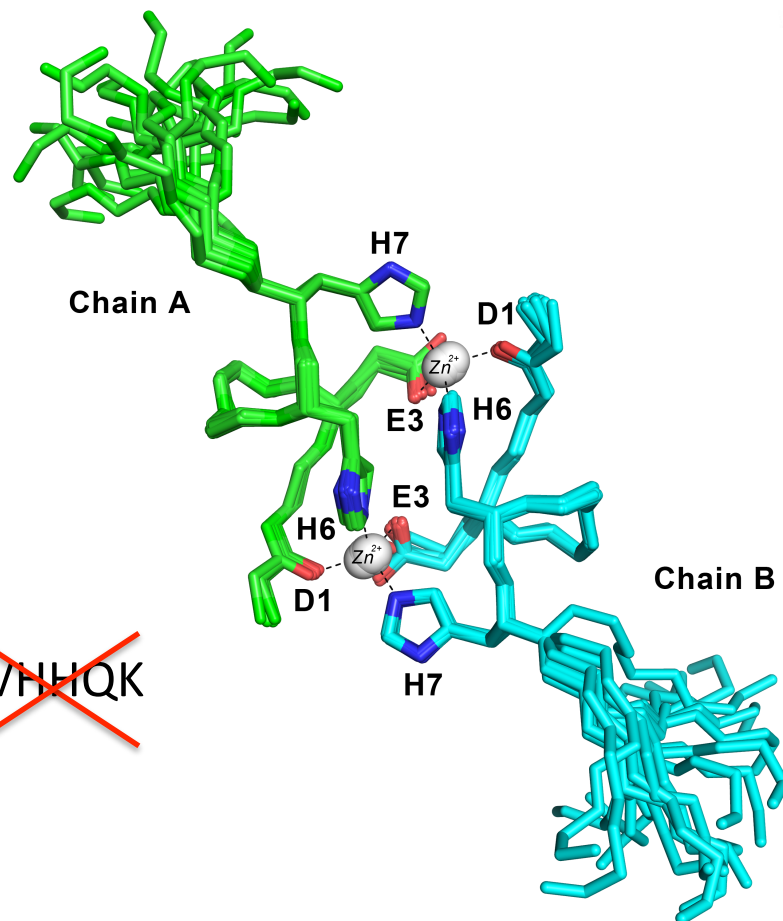
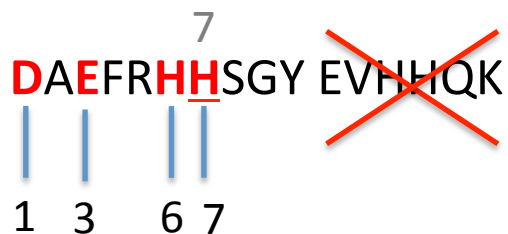


А6 1-16 / А6 1-16 D7iso



# Zn-связывающий домен А6 человека

А6 1-10 человека мутант D7H



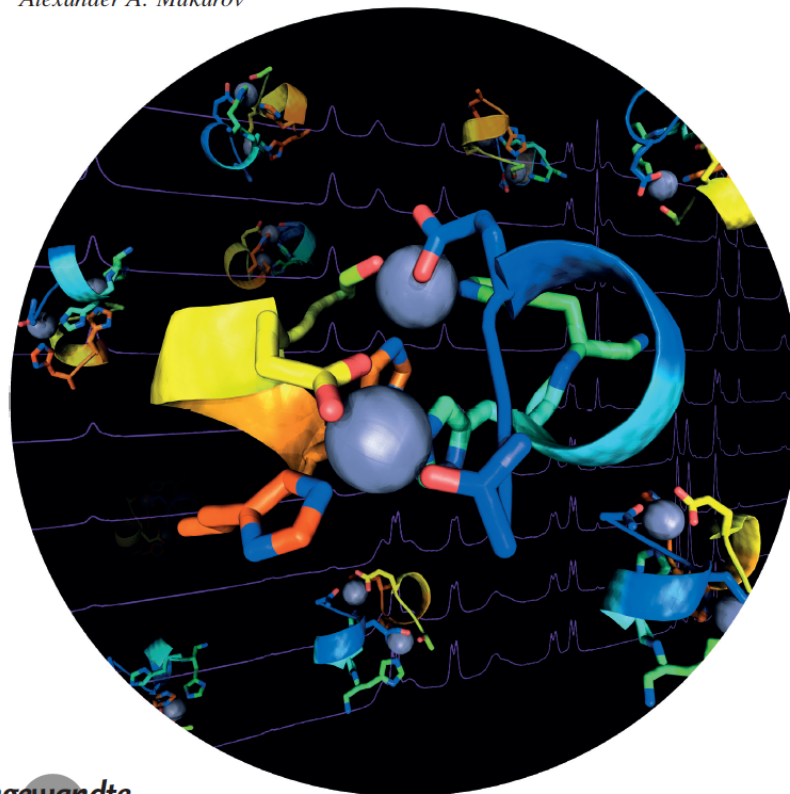
- 2 иона цинка
- Новая топология
- Уточнение координации цинка – DFT функционал B3LYP, базис 6-311+G(2d,2p)

Alzheimer's Disease

International Edition: DOI: 10.1002/anie.201704615  
German Edition: DOI: 10.1002/ange.201704615

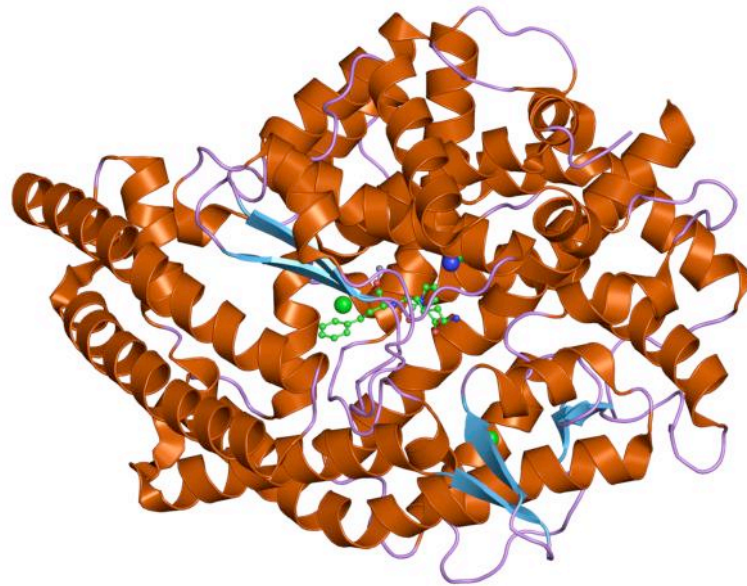
## A Binuclear Zinc Interaction Fold Discovered in the Homodimer of Alzheimer's Amyloid- $\beta$ Fragment with Taiwanese Mutation D7H

Vladimir I. Polshakov,\* Alexey B. Mantsyzov, Sergey A. Kozin, Alexei A. Adzhubei, Sergey S. Zhokhov, Wouter van Beek, Alexandra A. Kulikova, Maria I. Indeykina, Vladimir A. Mitkevich, and Alexander A. Makarov\*

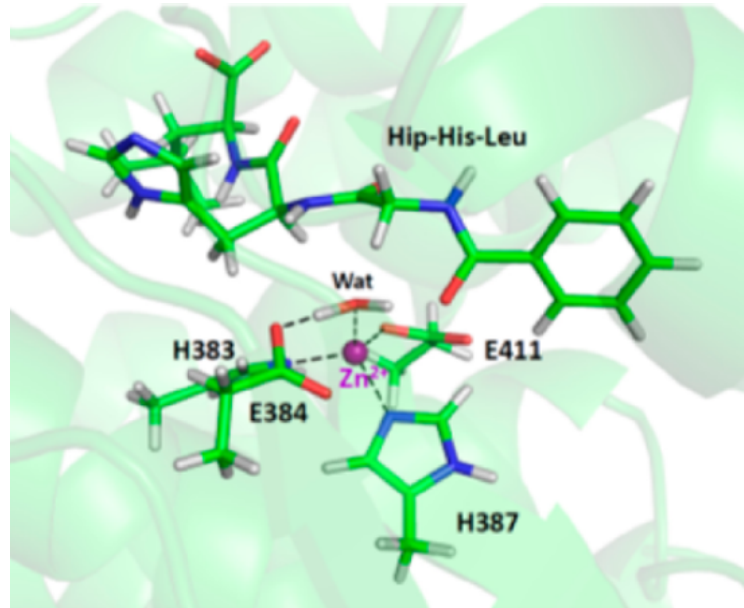


## Аб – субстрат АПФ

- Ангиотезинпревращающий фермент
- Широкая субстратная специфичность
- Мишень для антигипертензивных средств
- Расщепляет Аб
- Мутации АПФ ассоциированы с повышенным риском БА

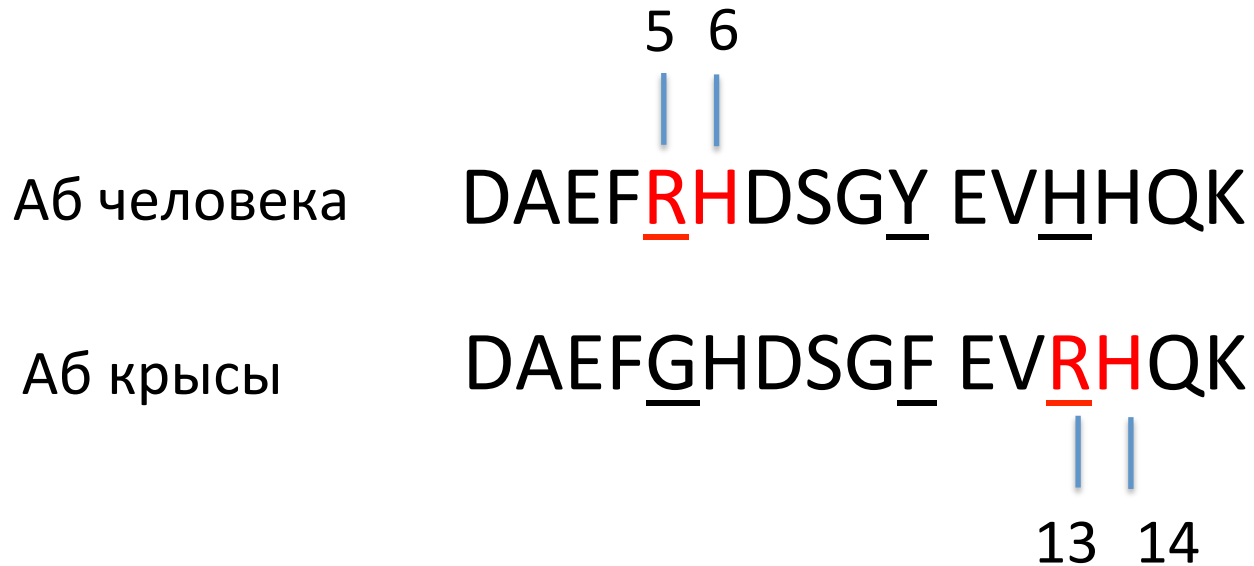


# АПФ: каталитический сайт



- Субстрат располагается в тоннеле
- Активный центр одержит ион цинка
- Молекула воды вовлечена в катализ

## Аб 1-16 – субстрат АПФ



- Различные сайты протеолиза Аб крысы и человека



# АПФ: моделирование комплекса Михаэлиса с пептидами АБ

Аб человека

<sup>4</sup>FRHD<sup>7</sup>

<sup>12</sup>VHHQ<sup>15</sup>

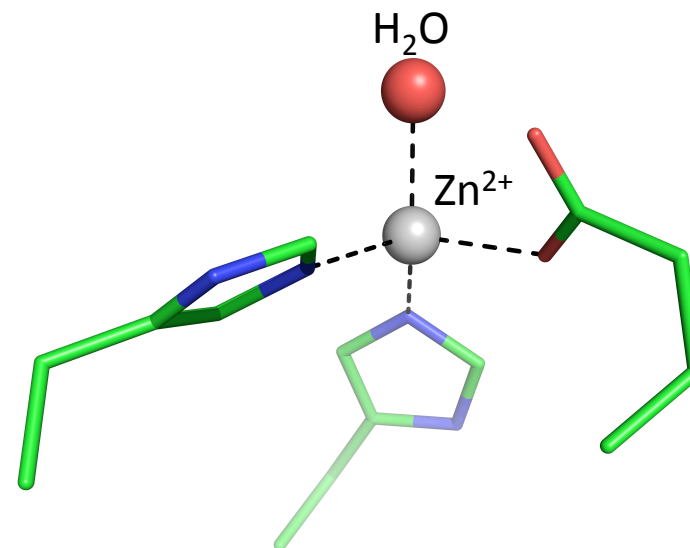
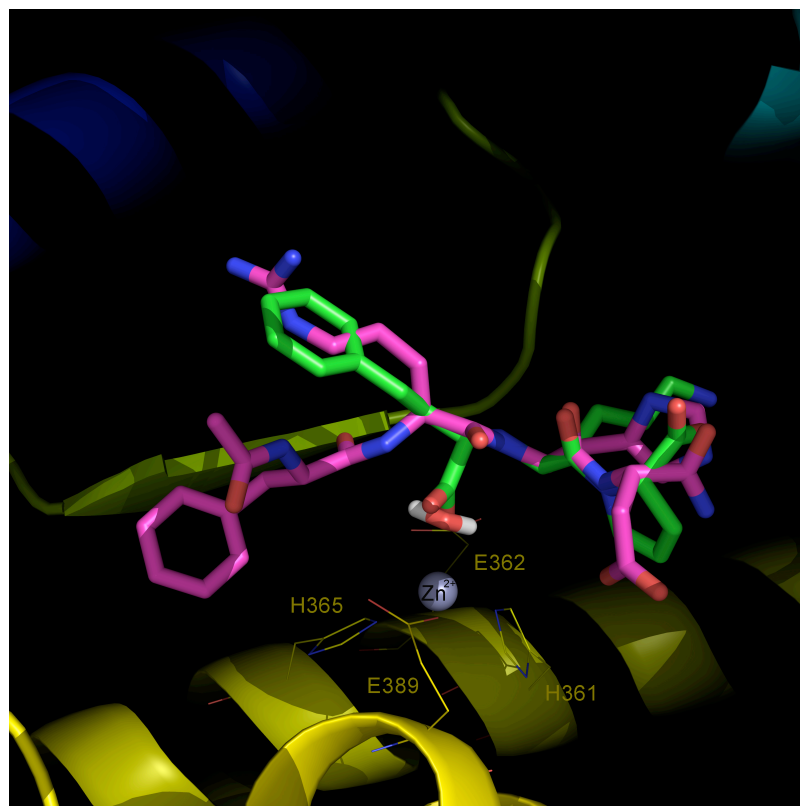
Аб крысы

<sup>4</sup>FGHD<sup>7</sup>

<sup>12</sup>VRHQ<sup>15</sup>

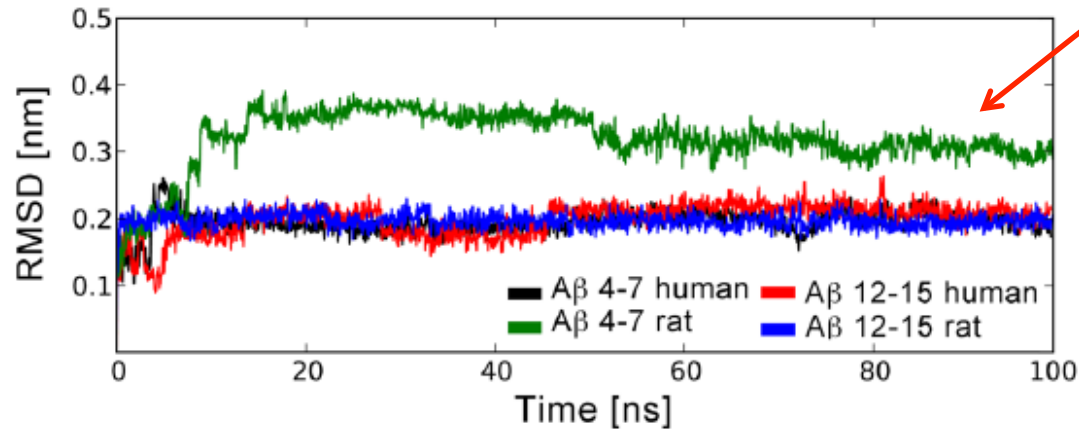
Суперпозиция  
на структуру лизоноприла

DFT-оптимизированная  
координационная сфера Zn<sup>2+</sup>

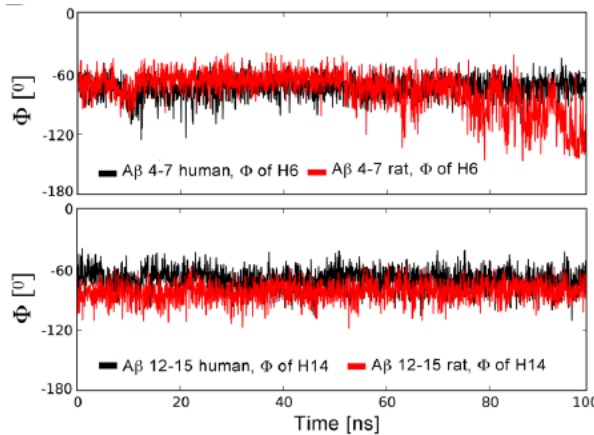
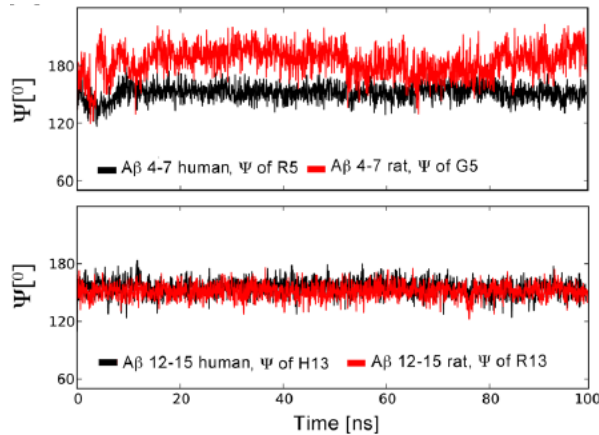


Функционал B3LYP,  
базис 6-31G\*

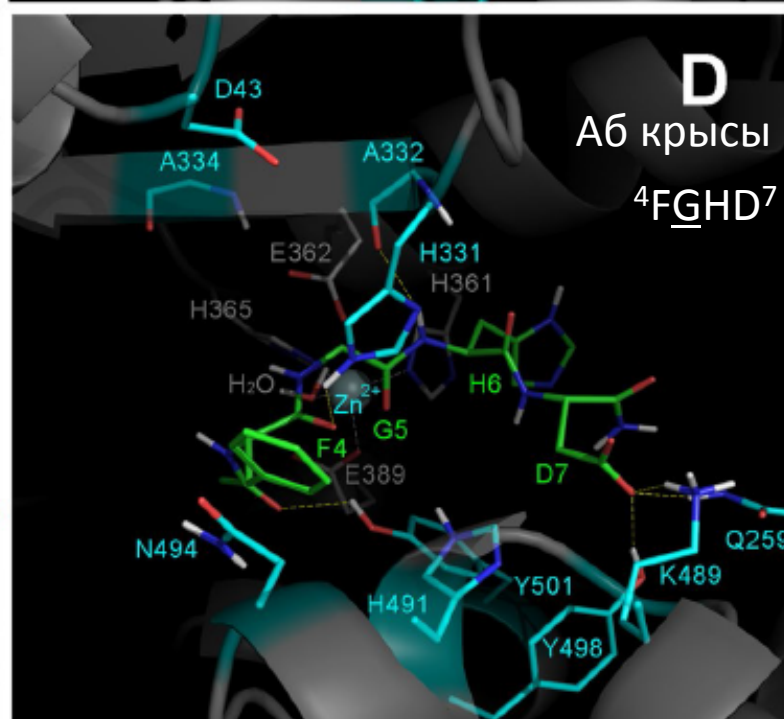
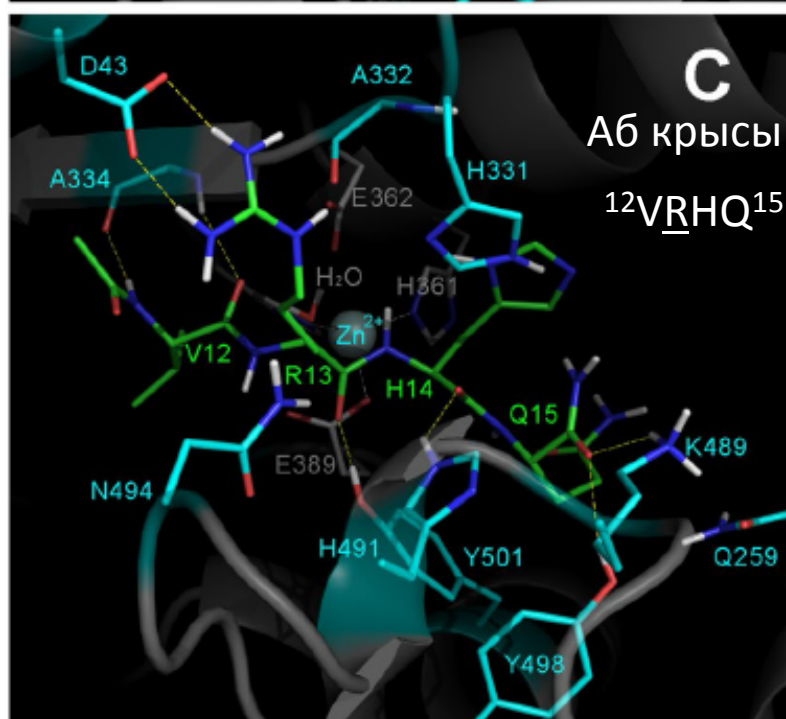
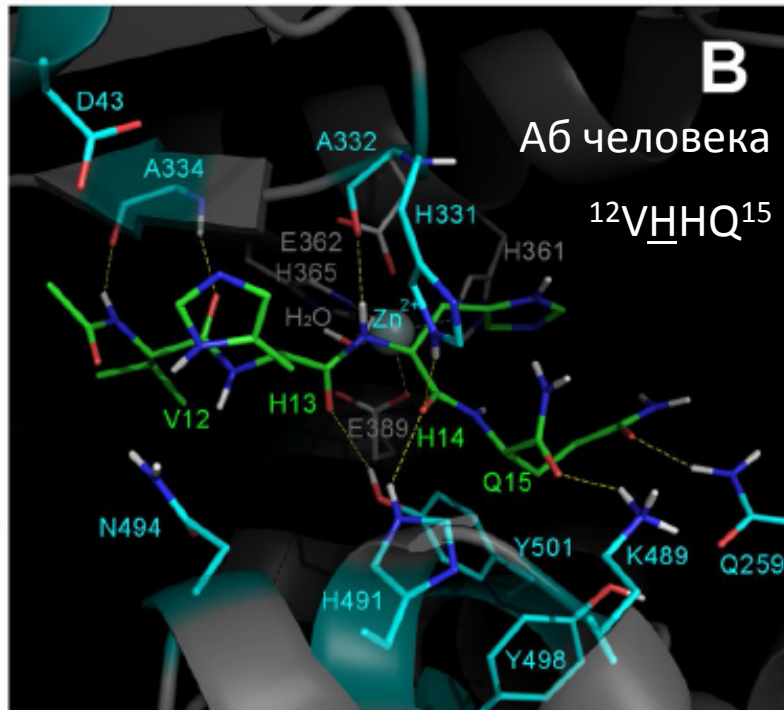
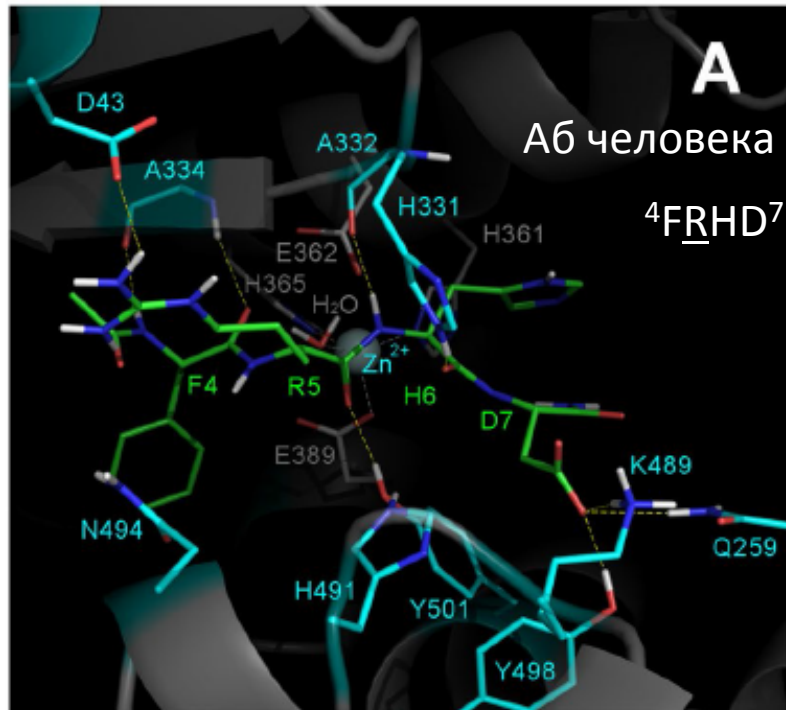
# АДФ: моделирование комплекса Михаэлиса с пептидами Аβ



Аб крысы  
 ${}^4\text{FGHD}^7$



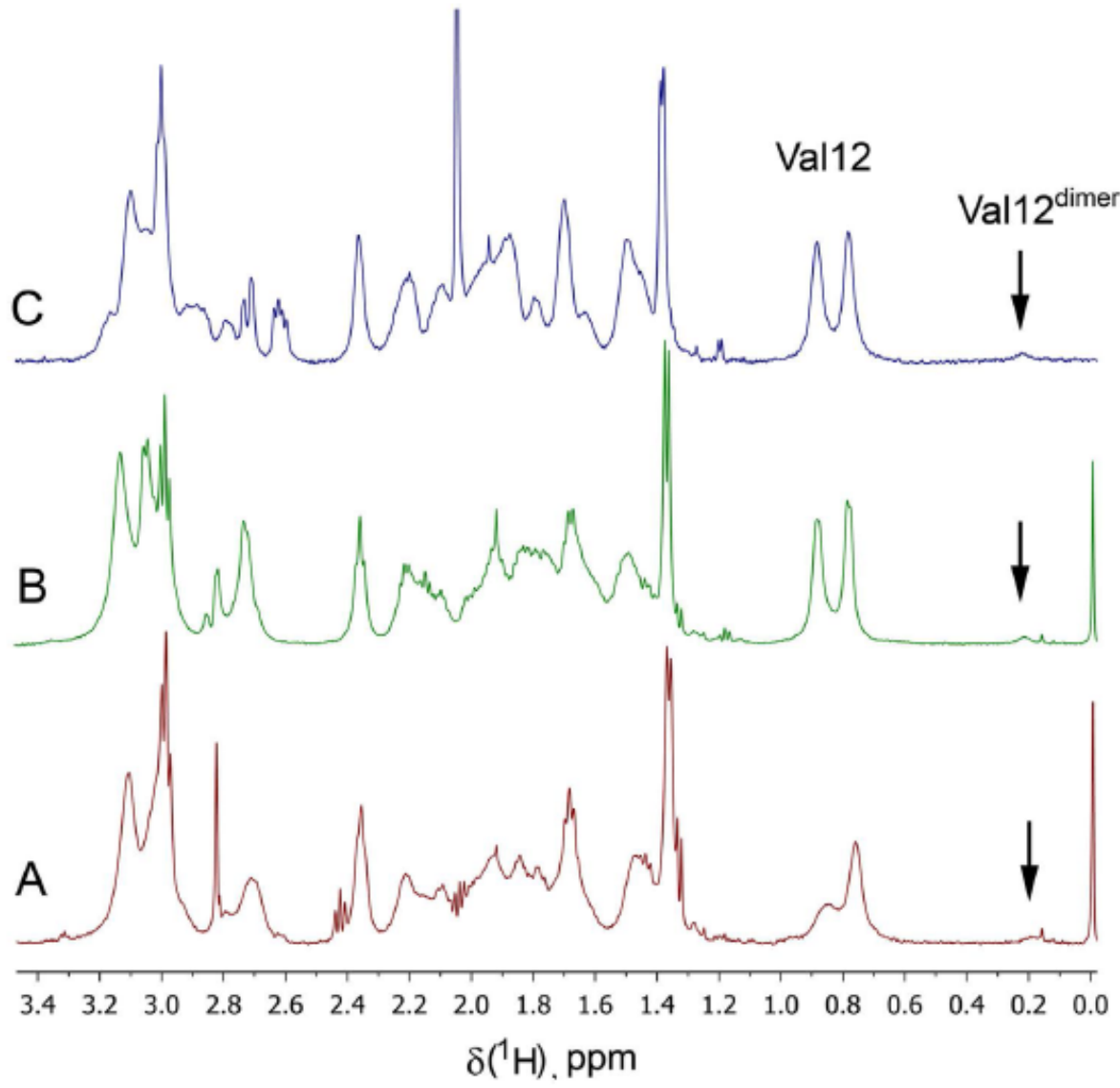
Значительно большая подвижность основной цепи  ${}^4\text{FGHD}^7$  в активном сайте





|              |  |
|--------------|--|
| BK           | RP <u>P</u> GF <u>S</u> PF <u>R</u>      |
| Des-Arg9 BK  | R <u>P</u> PG <u>F</u> SP <u>F</u>       |
| GnRH         | pEHWSYGL <u>R</u> PnG                    |
| Ang I        | DRVY <u>I</u> HP <u>F</u> HL             |
| Ang 1-7      | DRVY <u>I</u> HP                         |
| Heptapeptide | YGG <u>F</u> M <u>R</u> F                |
| Octapeptide  | YGG <u>F</u> M <u>R</u> GL               |
| Substance P  | RPKP <u>Q</u> Q <u>F</u> GLnM            |
| Neurotensin  | ELYENK <u>P</u> RR <u>P</u> Y <u>I</u> L |
| AB 16 rat    | DAEFGHDSG <u>F</u> EV <u>R</u> HQK       |
| AB 16 hum    | DAEFRHDSG <u>F</u> EV <u>H</u> HQK       |
| AB 16 hum    | DAEFRHDSG <u>Y</u> EV <u>H</u> HQK       |

Спасибо за внимание!



A616 D7iso

A616 H6R

A616

**TABLE 1** Thermodynamic parameters of zinc ions binding to rat A $\beta$ (1–16) and its mutants obtained by ITC at 25°C in 50 mM Tris buffer, pH 7.3

| Peptide | N    | $K_a \times 10^4$ (M <sup>-1</sup> ) | $\Delta H$ (kcal M <sup>-1</sup> ) | T $\Delta S$ (kcal M <sup>-1</sup> ) |
|---------|------|--------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| Wt      | 0.60 | 1.53                                 | -4.8                               | 0.9                                  |
| D1A     | 0.70 | 0.98                                 | -3.5                               | 1.9                                  |
| E3A     | 1.20 | 0.71                                 | -1.8                               | 3.6                                  |
| H6A     |      |                                      | No binding                         |                                      |
| D7A     | 0.70 | 1.01                                 | -2.9                               | 2.6                                  |
| E11A    | 1.00 | 1.44                                 | -1.4                               | 4.3                                  |
| H14A    |      |                                      | No binding                         |                                      |

Standard deviations of binding stoichiometry (N) and enthalpy ( $\Delta H$ ) measurements do not exceed 10%, and those of the affinity constant ( $K_a$ ) measurements do not exceed 20%.

**Table S3.** Thermodynamic parameters of Zn<sup>2+</sup> binding to the peptides A $\beta$ <sub>1-10</sub>, D7H-A $\beta$ <sub>1-10</sub> and D7H-A $\beta$ <sub>1-7</sub> obtained by ITC at 25°C in 50 mM Tris buffer, pH 7.3.

| Peptide                       | N | K <sub>a</sub> ×10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup> | $\Delta H^b$<br>(kcal·mol <sup>-1</sup> ) | T $\Delta S$<br>(kcal·mol <sup>-1</sup> ) | $\Delta G$<br>(kcal·mol <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------------|---|---|---|---|---|
| A $\beta$ <sub>1-10</sub>     | 1 | 0.9 M <sup>-1</sup>                           | -3.3                                      | -2.1                                      | -5.4                                    |
| D7H-A $\beta$ <sub>1-10</sub> | 1 | 4.1 M <sup>-3</sup>                           | -10.4                                     | -4.1                                      | -6.3                                    |
| D7H-A $\beta$ <sub>1-7</sub>  | 1 | 3.7 M <sup>-3</sup>                           | -8.9                                      | -2.7                                      | -6.2                                    |

<sup>a</sup> Standard deviation does not exceed  $\pm 10\%$ .

<sup>b</sup> Standard deviation does not exceed  $\pm 20\%$ .