

Молекулярные взаимодействия пептидов β -амилоидов, как неупорядоченных белков, и перспективных лекарственных средств на основе D-энантиомерных пептидов

Бочаров Э.В.^{1, 2*}, Охрименко И.С.¹, Волынский П.Е.², Павлов К.В.¹,
Злобина В.В.¹, Бершадский Я.В.^{1, 2}, Крючкова А.К.^{1, 2}, Кузьмичев П.К.¹,
Ефремов Р.Г.^{1, 2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Россия

²Институт биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, Россия

* edvbon@mail.ru

Ключевые слова: терапия болезни Альцгеймера; белок-предшественник амилоида; трансмембранный домен; белок-липидные и белок-белковые взаимодействия; ЯМР-спектроскопия; молекулярная динамика

Мотивация и цель: Болезнь Альцгеймера (БА) – разрушительное нейродегенеративное заболевание, приводящее к тяжелой деменции. Детальная информация о структуре, динамике и межмолекулярных взаимодействиях биомолекул, непосредственно участвующих в развитии болезни Альцгеймера, необходима для рациональной разработки новых биологически активных соединений и скрининга существующих с целью получения наиболее эффективных кандидатов в лекарственные средства [1]. Генетические данные убедительно свидетельствуют о том, что аберрантное образование, агрегация и/или клиренс нейротоксических пептидов амилоида- β (A β), являющегося продуктом последовательного расщепления белка-предшественника амилоида (APP), запускает заболевание. A β аккумулируется в местах контакта нейронов в токсические олигомеры и фибриллы, образуя так называемые сенильные бляшки. При этом изоформы A β различной длины обнаруживаются в мозгу здоровых людей независимо от возраста и, по-видимому, играют роль в сигнальных путях в головном мозге и обладают нейропротекторными свойствами при низких концентрациях. D-энантиомерный пептид D3 и его производные недавно были отобраны коллегами из университета г. Дюссельдорф (Германия) с помощью фагового дисплея для прямого разрушения цитотоксических агрегатов A β [2]. В настоящее время одно из D3-подобных соединений должно пройти фазу II клинических испытаний, однако молекулярные детали его профилактического или фармакологического действия не совсем ясны.

Методы и алгоритмы: Для решения проблемы мы использовали комплексный подход, основанный на биохимических и биофизических методах, таких как белковая инженерия, микроскопический термофорез, флуоресцентная конфокальная микроскопия, флуоресцентная поляризация, калибровка микрофлюидной диффузии, круговой дихроизм, спектроскопия ядерного магнитного резонанса высокого разрешения (ЯМР) и компьютерное моделирование.

Результаты: В работе мы представляем экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что D3-пептид, будучи внутренне неупорядоченным пептидом (IDP), может динамически и специфически связываться IDP/IDP-подобным образом с внеклеточной частью мембраносвязанного A β -предшественника, трансмембранным CTG β фрагментом белка-предшественника амилоида (APP₆₇₂₋₇₂₆, A β ₁₋₅₅ в нумерации β -амилоида). В частности, гетероядерная ЯМР-спектроскопия показала, что D3-пептид напрямую связывается с амфифильной примембранным JM-участком A β ₁₇₋₂₆, который в зависимости от внешних условий способен претерпевать конформационный переход из α -спиральной в β -конформацию и участвует в свертывании β -амилоида в фибриллы. Также было протестировано влияние ряда патогенных мутаций БА, локализованных в различных структурных и функциональных частях APP, на связывание D3-пептида.

Выводы: Полученные данные свидетельствуют о том, что D-энантиомерный пептид D3 распознает амилоидогенный участок мембранного белка APP и его фрагментов – A β пептидов, ограничивая их конформационное разнообразие, не нарушая α -спиральности и предотвращая образование межмолекулярных водородных связей. Это создает предпосылки для ингибирования ранних стадий превращения A β пептидов в β -конформацию и последующей токсической олигомеризации, связанной с ранними стадиями развития болезни Альцгеймера [3]. Достигнутый прогресс в понимании молекулярного механизма действия D3-пептида является важным шагом на пути к разработке эффективной стратегии лечения и профилактики болезни Альцгеймера.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-74-00024, <https://rscf.ru/project/23-74-00024/>.

Molecular interactions of β -amyloid peptides, as disordered proteins, and promising drugs based on all-D-enantiomeric peptides

Bocharov E.V.^{1, 2*}, Okhrimenko I.S.¹, Volynsky P.E.², Pavlov K.V.¹, Zlobina V.V.^{1, 2}, Bershatsky Ya.V.^{1, 2}, Kryuchkova A.K.¹, Kuzmichev P.K.¹, Efremov R.G.^{1, 2}

¹ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia

* edvbon@mail.ru

Key words: Alzheimer's disease treatment; amyloid precursor protein; transmembrane domain; protein-lipid and protein-protein interactions; NMR spectroscopy; molecular dynamics

Motivation and Aim: Alzheimer's disease (AD) is a devastating neurodegenerative disease that leads to severe dementia. Detailed information on the structure, dynamics and intermolecular interactions of biomolecules directly involved in the development of Alzheimer's disease is necessary for the rational development of new biologically active compounds and screening of existing ones in order to obtain the most effective drug candidates [1]. Genetic evidence strongly suggests that aberrant production, aggregation, and/or clearance of neurotoxic amyloid- β (A β) peptides, being the products of sequential cleavage of transmembrane amyloid precursor protein (APP), triggers disease. A β

accumulates at the toxic oligomers and fibrils, forming so-called senile plaques. However, A β isoforms of varying lengths are found in the brain of healthy people regardless of age and appear to play a role in signaling pathways in the brain and have neuroprotective properties at low concentrations. All-D-enantiomeric peptide D3 and its derivatives were recently selected by the colleagues from the University of Dusseldorf (Germany) using phage display for direct destruction of cytotoxic A β aggregates [2]. Currently, one of the D3-like compounds is about to enter phase II clinical trials, but the molecular details of its prophylactic or pharmacological effects are not entirely clear.

Methods and Algorithms: To solve the problem, we used complex approach based on biochemical and biophysical methods such as protein engineering, microscopic thermophoresis, fluorescence confocal microscopy, fluorescence polarization, microfluidic diffusion calibration, circular dichroism, high resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and computer simulation.

Results: We present experimental evidence showing that D3-peptide, being an intrinsically disordered peptide (IDP), can dynamically and specifically bind in IDP/IDP-like manner to the extracellular juxtamembrane (JM) region of membrane-bound A β precursor, CTF β transmembrane fragment of amyloid precursor protein (APP₆₇₂₋₇₂₆, A β ₁₋₅₅ in amyloid- β numeration). Namely, heteronuclear NMR spectroscopy showed that D3-peptide directly binds to the amphiphilic near-membrane JM region of A β ₁₇₋₂₆, which, depending on external conditions, is capable of undergoing a conformational transition from the α -helical conformation to the β -chain, which is involved in folding of β -amyloid into fibrils. The influence of a number of pathogenic AD mutations located in different structural and functional parts of APP on the peptide binding was also tested.

Conclusion: The data suggest that D-enantiomeric peptide D3 recognizes the amyloidogenic region of APP and its fragments – A β peptides, restricting conformational diversity not compromising its α -helicity and preventing intermolecular hydrogen bond formation, which would create prerequisites for inhibition of early steps of A β conversion into β -conformation and its toxic oligomerization associated with early stages of AD development [3]. The achieved progress in understanding the molecular mechanism of D3-peptide action is an important step towards development of an effective AD treatment and prevention strategy.

Funding: The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-74-00024, <https://rscf.ru/project/23-74-00024/>.

Список литературы/References

1. Urban A.S. et al. Structural Studies Providing Insights into Production and Conformational Behavior of Amyloid- β Peptide Associated with Alzheimer's Disease Development. *Molecules*. 2021;26(10):2897
2. Klein A.N., Gremer L., Kutzsche J., Willbold D. et al. Optimization of d-Peptides for A β Monomer Binding Specificity Enhances Their Potential to Eliminate Toxic A β Oligomers. *ACS Chemical Neurosci*. 2017;8(9):1889-1900
3. Bocharov E.V. et al. All-d-Enantiomeric Peptide D3 Designed for Alzheimer's Disease Treatment Dynamically Interacts with Membrane-Bound Amyloid- β Precursors. *J Med Chem*. 2021;64(22):16464-16479