

На правах рукописи

ЖЕМКОВ Владимир Андреевич

**СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БЕЛКОВ,
ВОВЛЕЧЁННЫХ В НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ
ПРОЦЕССЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ОСОБЕННОСТИ ИХ
МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ**

Специальность 03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург
2018

Работа выполнена в лаборатории молекулярной нейродегенерации Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», г. Санкт-Петербург.

Научный руководитель: **Безпрозванный Илья Борисович**,
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Самыгина Валерия Ролановна**,
кандидат физико-математических наук,
ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН,
НИЦ «Курчатовский институт»,
старший научный сотрудник

Крылов Борис Владимирович,
доктор биологических наук, профессор, ФГБУН
«Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН,
заведующий лабораторией

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7-9.

Защита состоится «19» декабря 2018 г. в 16-00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.229.25 при Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (ФГАОУ ВО «СПбПУ») по адресу: 194021, г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д. 11.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» по адресу: 195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., д. 29, а также на сайте ФГАОУ ВО «СПбПУ»: <http://www.spbstu.ru>.

Автореферат разослан « » _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук:

Линькова Наталья
Сергеевна

Общая характеристика работы

Актуальность работы. Нейродегенеративные заболевания (НДЗ) представляют собой совокупность различных по своей природе болезней ЦНС, поражающих различные отделы головного мозга. Многие наследственные НДЗ относят к т.н. конформационным болезням - группе дегенеративных заболеваний, в основе которых лежит нарушение трехмерной пространственной укладки определенных белковых молекул. Несмотря на многолетние исследования механизмов различных НДЗ, таких как болезни Альцгеймера, Хантингтона, Паркинсона, и поиск эффективных терапевтических подходов для их лечения, подавляющее большинство из них остаются неизлечимыми, а пациентам может быть предложено только симптоматическое лечение. Остаются плохо изученными структурные особенности и молекулярные механизмы функционирования и активации как нормальных, так и мутантных форм белков, вовлеченных в нейродегенеративные процессы. Для максимально полного понимания механизмов функционирования белков, лежащих в основе молекулярного патогенеза заболеваний, необходимо применение комплексных исследований, сочетающих биофизические, биохимические и структурные подходы.

Примером такого научного исследования может служить данная работа, где в качестве объектов для изучения были выбраны следующие белки: атаксин-3, хантингтин и рецептор сигма-1.

Атаксин-3 (ataxin-3, Atxn3), экспансия в гене которого приводит к возникновению спинозжечковой атаксии 3-го типа, относится к белкам, содержащим гомополимерные полиглутаминовые последовательности (полиГ). Имеющаяся до настоящего момента структурная информация о полиГ последовательности ограничена лишь кристаллическими структурами первого экзона хантингтина (Htt) с 17 и 36 повторами глутамина, а также кристаллической структурой полиглутаминового декапептида (10Г) в комплексе с анти-полиГ антителом. Однако, структура первого экзона хантингтина была определена с разрешением лишь 3.0–3.6 Å и осложнена присутствием множественных конформаций полиГ в кристалле, что затруднило определение положений боковых цепей аминокислотных остатков. Таким образом, важным продолжением структурных исследований белков, содержащих полиГ-последовательности, является определение кристаллической структуры полиГ высокого разрешения.

Подобные мутации экспансии триплета в гене хантингтина (Htt) приводят к развитию болезни Хантингтона (БХ). Ряд структурных и биофизических работ, объектом которых служил первый экзон хантингтина, продемонстрировали, что фланкирующие полиглутамин домены модулируют структуру полиГ тракта, его способность к агрегации и цитотоксичность. В частности, ранее было показано, что N-концевая последовательность, непосредственно предшествующая полиГ тракту (N17), является про-агрегационной. Согласно этой гипотезе, амфипатическая спираль N17 хантингтина гомоолигомеризуется, что, в свою очередь, приводит к сближению и увеличению локальной концентрации полиГ и последующей полиГ-опосредованной агрегации. Таким образом, перспективным подходом для будущей разработки веществ-прототипов лекарственных средств при БХ является

поиск небольших химических соединений, направленных на блокирование N17-зависимого этапа агрегации.

Рецептор сигма-1 человека (σ -1 receptor, S1R) является трансмембранным белком эндоплазматического ретикулума (ЭР), селективно связывающим широкий спектр соединений, известных, как сигма-лиганды. Доклинические и клинические испытания агонистов S1R показали эффективность фармакологической активации рецептора в ряде нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Хантингтона и Альцгеймера. Считается, что рецептор сигма-1 является плюрипотентным внутриклеточным модулятором, функционируя как анти-апоптотический белок в условиях клеточного стресса. Тем не менее, детальные механизмы функционирования S1R на молекулярном уровне остаются неизвестными. Отдельную перспективную область исследований представляет изучение взаимодействий S1R с липидами биологических мембран. Несмотря на ранее описанные в литературе последовательности связывания S1R с отдельными типами липидов, белок-липидные взаимодействия S1R и их функциональное значение на настоящий момент не изучены детально на молекулярном уровне.

Цель и задачи исследования. Целью исследования являлось установление структурных характеристик, определяющих межмолекулярные взаимодействия белков, вовлеченных в процессы развития нейродегенеративных заболеваний: атаксина-3, хантингтина и рецептора сигма-1 человека.

Соответствующие задачи исследования:

1. С помощью метода рентгеноструктурного анализа белков установить атомную кристаллическую структуру C-концевого полиглутамин-содержащего участка белка атаксин-3.

2. Путем синтеза пептоидной библиотеки соединений разработать и синтезировать вещества, специфически связывающиеся с N-концевой областью N17 хантингтина, а также оценить их антиагрегационные и нейропротекторные свойства.

3. С помощью биофизических и биохимических экспериментов исследовать белок-липидные взаимодействия сигма-1 рецептора, а также идентифицировать отвечающие за них структурные особенности белковой молекулы.

4. Определить функциональную значимость белок-липидных взаимодействий рецептора сигма-1 в клетках линии HEK293T и первичных культурах нейронов.

Основные положения, выносимые на защиту. На защиту выносятся следующие положения:

1. Полиглутаминовый тракт белка атаксина-3 находится в двух конформационных состояниях: свободной петли и альфа-спирали. Альфа-спиральная конформация стабилизирована двумя протяженными сетями водородных связей: между атомами пептидной группы i и $i + 4$ остатков и между карбокси- и аминогруппами боковых цепей остатков глутамина; при этом водородные связи между боковыми цепями ориентированы параллельно оси альфа-спирали.

2. Пептоидное соединение HNP1 специфически связывается с аминоконцевой областью (N17) хантингтина. Пептоидное соединение HNP1

предотвращает амилоидогенную агрегацию хантингина *in vitro* и является нейропротектором в модели болезни Хантингтона.

3. Рекомбинантный рецептор сигма-1 человека кластеризуется на поверхности холестерин-содержащих липосом.

4. Сверхэкспрессия рецептора S1R, локализующегося в митохондриально-ассоциированных мембранах, в клеточной линии НЕК293Т приводит к увеличению контактной длины между эндоплазматическим ретикулумом и митохондриями. Замены аминокислотных остатков в холестерин-связывающей SARC-последовательности приводят к неправильному позиционированию рецептора в клетке. Функционально-активный рецептор необходим для поддержания синаптических контактов в модельных гиппокампальных культурах нейронов *in vitro*.

Научная новизна работы. Впервые установлена кристаллическая структура С-концевой области атаксина-3 с наиболее высоким на данный момент разрешением 2,2 Å. Показано, что полиГ тракт атаксина-3 может существовать в двух конформациях: свободной петли и альфа-спирали; при этом, уникальной структурной особенностью альфа-конформации полиГ является наличие двух сетей водородных связей (между атомами полипептидного остова и между боковыми цепями аминокислотных остатков). Синтезирована библиотека пептоидных соединений и идентифицировано пептоидное соединение HNP1, специфически связывающееся с N-концевой областью (N17) хантингина. Продемонстрировано, что вещество HNP1 обладает анти-агрегационными и нейропротекторными свойствами *in vitro*, подавляя агрегацию белка слияния Htt-82Q-GFP в клетках линии НЕК239Т и предотвращая дегенерацию синаптических контактов в клеточной модели болезни Хантингтона. Для рецептора сигма-1 человека показано, что он способен связываться с главными липидными компонентами рафтовых микродоменов: холестерином и сфингомиелинами. Рецептор сигма-1 человека был впервые реконструирован в модельные бислойные «гигантские» липосомы. Продемонстрировано, что встраивание рецептора в холестерин-содержащие бислои приводит к кластеризации рецептора и холестерина на мембране. Идентифицирован сайт узнавания холестерина в составе трансмембранного домена. Показано, что наличие стерол-связывающего мотива отвечает за правильное позиционирование S1R в митохондриально-ассоциированные области ЭР. Продемонстрировано увеличение контактной длины между ЭР и митохондриями при сверхэкспрессии S1R человека в линии НЕК293Т. Показано, что функционально-активный рецептор сигма-1 необходим для поддержания синаптических контактов в гиппокампальных культурах *in vitro*.

Научно-практическое значение работы. Представленные данные имеют фундаментальное и практическое значение. Установленная структура полиГ тракта высокого разрешения представляет собой новые данные, объясняющие поведение и фолдинг гомополимерных последовательностей полиГ. Впервые показана эффективность применения пептоидных молекул, связывающихся с аминоконцевой областью хантингина, в качестве веществ-прототипов лекарственных средств на клеточной модели БХ. Соединение HNP1 может быть в дальнейшем использовано для разработки более высокоспецифичных производных. Рассмотренные белок-липидные взаимодействия S1R1 имеют

важное значение для понимания фундаментальных основ функционирования рецептора в клетке. Разработанная методика встраивания рецептора в бислоиные мембраны может использоваться для изучения биофизических основ модуляции белков-партнеров. Полученные в настоящей работе результаты используются в курсах лекций кафедры «Медицинская физика» ИФНиТ СПбПУ: «Основы рентгеноструктурного анализа белков в нейробиологии», «Прикладные проблемы нейробиологии».

Личный вклад автора. Основные результаты диссертационной работы получены лично автором с использованием экспериментальной базы Лаборатории Молекулярной нейродегенерации СПбПУ (Санкт-Петербург, Россия) и лаб. И.Б. Безпрозванного, Юго-Западный медицинский центр Университета Техаса (UTSW Medical Center, Даллас, США). Планирование экспериментов и обсуждение полученных результатов проводилось совместно с научными руководителями: д.б.н. И.Б. Безпрозванным и Dr. MeeWhi Kim. Автор принимал непосредственное участие в выполнении представленных в работе экспериментов, если не указано обратное: эксперименты на нейрональных культурах были выполнены асп. ЛМН Н.А. Красковской и сотрудником UTSW Medical Center Dr. Daniel Ryskamp. Пептоидная библиотека была синтезирована сотрудником СПбГУ к.х.н. П.Р. Голубевым. Эксперименты по кристаллизации МВР-Atxn3-С проводились совместно с Dr. MeeWhi Kim. Сбор дифракционных данных осуществлялся при поддержке сотрудников лаборатории структурной биологии UTSW Medical Center и синхротрона Advanced Photon Source (Аргонн, США). Обработка данных, подготовка результатов к публикациям проводилась лично автором, тексты публикаций подготавливались совместно с соавторами.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на следующих российских и международных конференциях: The 18th International Conference on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease, 30 июня–4 июля 2013 г, г. Кируна, Швеция), Всероссийской конференции «Системно-технические решения проблем визуализации в нейродегенерации» (23–25 октября 2013 г, г. Санкт-Петербург, Россия), XLII научно-практической конференции с международным участием «Неделя науки СПбГПУ» (2–7 декабря 2013 г, г. Санкт-Петербург, Россия), Calcium 2014: From basics to bedside, (3–5 июля 2014 г, г. Стокгольм, Швеция), совместном семинаре Лаборатории молекулярной нейродегенерации и лаборатории А. Аперии (3 июля 2014 г., Каролинский Институт, г. Стокгольм, Швеция), Международной научной конференции Science of the Future (17–20 сентября 2014 г, г. Санкт-Петербург, Россия), XVII Зимней молодежной школе ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (29 февраля–5 марта 2015 г, п. Роцино, Россия), The 12th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases (18–22 марта 2015 г, г. Ницца, Франция), V съезде биофизиков России (4–10 октября 2015 г, Ростов-на-Дону, Россия), II Конференции молодых ученых и специалистов ПИЯФ «КМУС-2015» (11–13 ноября 2015 г, г. Гатчина, Россия), Форуме с международным участием «XLIV Неделя Науки СПбПУ» (30 ноября–5 декабря 2015 г, г. Санкт-Петербург, Россия), Gordon Research Conferences: Neurobiology of Brain Disorders (7–12 августа 2016 г, г. Жирона, Испания), Форуме с международным участием «XLV Неделя Науки СПбПУ» (14–19 ноября 2016 г., г. Санкт-Петербург, Россия).

Основные результаты по теме диссертационной работы опубликованы трех научных статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, а также в материалах научных конференций (16 тезисов).

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей методологическую часть и результаты исследования, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего 276 источников. Работа изложена на 147 листах машинописного текста, включает 26 рисунков и 3 таблицы.

Содержание работы

Во введении обосновывается актуальность диссертационного исследования, ставится цель и соответствующие задачи работы. Обоснована научно-практическая значимость диссертационной работы, а также методы и методология исследования, формулируются основные положения, выносимые на защиту. Описана апробация работы и личный вклад автора, а также приведена характеристика структуры и объема диссертации.

В первой главе диссертации рассмотрена актуальная литература по теме исследования. Первый параграф посвящен описанию структуры и функции белка атаксина-3, мутации в гене которого приводят к возникновению аутосомно-доминантно наследуемого заболевания — спинально-мозжечковой атаксии 3-го типа. Рассмотрена функция белка в клетке и описана доменная организация атаксина-3. Поскольку объектом настоящего исследования являлось установление кристаллической структуры C-концевой области, содержащей полиглутаминовый тракт, отдельное внимание уделено структурным и биофизическим исследованиям гомополимерных полиГ-последовательностей. Несмотря на фундаментальную значимость структурной информации о полиГ, кристаллические структуры доступны лишь для хантингтина с 17 и 36 остатками полиглутамина и полиГ пептида в комплексе с анти-полиГ антителом. В заключении параграфа приводится методологический раздел, посвященный рентгеноструктурному анализу белков. Во втором параграфе описывается структурная организация хантингтина, экспансия триплета CAG в гене которого приводит к развитию БХ. Рассматриваются возможные механизмы токсичности полиГ тракта на молекулярно-клеточном уровне. Отдельное внимание посвящено структурно-функциональным взаимоотношениям полиГ тракта Htt и фланкирующих его последовательностей: N-концевой области (N17) и полипролинового тракту. Рассматриваются имеющиеся на настоящий момент подходы, направленные на предотвращение агрегации мутантного Htt, одним из которых может являться поиск веществ или соединений, связывающихся с N17. Ранее было показано, что домен N17 является про-агрегационным, и гомоолигомеризация этого домена является первым этапом агрегации Htt. Ранее на клеточных и мышечных моделях БХ была показана эффективность применения выработанных против N17 анти- и интрател. Таким образом, делается вывод, что подход с использованием N17 в качестве терапевтической мишени является обоснованным. В третьем параграфе рассматриваются молекулярно-биологические и структурные характеристики рецептора сигма-1 человека. Этот

трансмембранный белок эндоплазматического ретикулула связывает спектр соединений, многие из которых в настоящее время широко используются в клинической практике. На клеточных и мышечных моделях ряда НДЗ была показана эффективность фармакологической активации рецептора с применением селективных сигма-агонистов. Однако, механизм функционирования S1R остается неизвестным несмотря на многолетние исследования. Считается, что S1R функционирует как белок-«шаперон» или дополнительная регуляторная субъединица в условиях клеточного стресса, регулируя широкий спектр ионных каналов и рецепторов на плазматической мембране и мембранах ЭР. Ряд статей указывает на то, что, для нормального функционирования рецептора сигма-1 значимую роль могут играть белок-липидные взаимодействия. Таким образом, актуальным направлением дальнейших исследований является выяснение биофизических основ взаимодействия рецептора с липидами, что до этого времени не было осуществлено в научной практике. В заключении параграфа рассматриваются биофизические подходы для изучения мембранных белков в искусственных бислойных мембранах, липидный состав биологических мембран и структурные характеристики основных классов липидов.

Во второй главе описана экспериментальная часть работы: материалы и методы, использованные в настоящем исследовании.

Генетические конструкции для гетерологической экспрессии белков и гены слияния с GFP были получены стандартными методами молекулярного клонирования. Белки с точечными мутациями были получены с помощью сайт-направленного мутагенеза. Белки MBR, MBR-Htt-17Q, MBR-Htt48Q, MBR-Htt-82Q, MBR-Htt-138Q, MBR-Atxn3-C были получены в экспрессионной системе *E. coli* и очищены с помощью аффинной хроматографии на амилозной смоле. Для кристаллизационных экспериментов MBR-Atxn3-C был дополнительно очищен с помощью гель-фильтрационной хроматографии. Рекомбинатный 6*His-S1R был получен в бакуловиральной системе экспрессии, выделен и очищен с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-агарозе, ионообменной хроматографии (monoQ) и гель-фильтрации.

MBR-Atxn3-C был закристаллизован методом диффузии водяных паров в модификации «висячая капля». Кристаллы были заморожены в жидком азоте, сбор дифракционных данных осуществляли на линии 19 ID синхротрона Advanced Photon Source (Аргонн, США). Первичную обработку дифракционных изображений проводили в программе HKL2000. На этом этапе осуществлялся поиск дифракционных максимумов hkl , определение сингонии и параметров элементарной ячейки кристалла. На этапе интегрирования определяли интегральную интенсивность дифракционных максимумов на дифрактограммах для расчета модулей структурных факторов $|F_{hkl}|$. Определение фаз осуществляли методом молекулярного замещения с использованием структуры MBR (PDB ID: 1ANF). Для определения положения поисковой молекулы в элементарной ячейке кристалла использовался поиск в пространстве Паттерсона (PHASER). При этом рассчитывались карты межтомных векторов Паттерсона по амплитудам структурных факторов:

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_{h, k, l} |F_{hkl}|^2 \cos 2\pi(hu + kv + lw) \quad \text{— (1) синтез Паттерсона.}$$

Правильное положение молекулы в элементарной ячейке кристалла соответствует максимальному перекрытию функций для поисковой и искомой структур. На практике, проблема поиска решается путем нахождения максимумов функций вращения и трансляция молекулы в элементарной ячейке кристалла.

Функция вращения описывается следующим образом:

$$Rot(\mathbf{R}) = \int_{(V)} P_{obs}(\mathbf{u}) \cdot P_{calc}(\mathbf{R} \cdot \mathbf{u}) d^3u \quad \text{— (2), где}$$

$P_{obs}(\mathbf{u})$ — функция Паттерсона для экспериментального набора данных, $P_{calc}(\mathbf{R} \cdot \mathbf{u})$ — функция Паттерсона для поисковой модели, \mathbf{R} — матрица вращения, $\mathbf{u} = (u, v, w)$. На втором этапе осуществляется трансляционный поиск в элементарной ячейке кристалла:

$$Tr(\mathbf{T}) = \int_{(V)} P_{obs}(\mathbf{r}) \cdot P_{calc}(\mathbf{r} - \mathbf{T}) d^3r \quad \text{— (3) функция трансляции}$$

\mathbf{T} — вектор переноса (трансляции).

После определения фаз становится возможным расчет распределения электронной плотности по формуле

$$\rho(x, y, z) = \sum_{h, k, l} |F_{hkl}| \exp(i\varphi_{hkl}) \exp(-2\pi i(hx + ky + lz)) \quad \text{— (4).}$$

Помимо этого, на каждом этапе перестроения и уточнения модели рассчитывается дифференциальная карта электронной плотности, для выявления ошибок модели:

$$\Delta\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h, k, l} (F_{obs} - F_{calc}) \exp i\varphi_{calc} \cdot \exp(-2\pi i(hx + ky + lz)) \quad \text{— (5).}$$

Для расчета исключенных (ОМТ) карт электронной плотности в расчет не включались атомы участка, для которого рассчитывалось распределение.

Модели строили независимо для каждого из кристаллов и для каждой молекулы в составе элементарной ячейки кристалла (в случае кристалла С2) в программе Соот. На этапе уточнения структуры такие параметры, как координаты атомов, занятости, тепловые В-факторы варьируются с целью достижения максимального соответствия между экспериментальной и расчетной дифракционными картинками. Количественной мерой этого соответствия являются R/R_{free} факторы. Уточнение проводили в программе Refmac5, расчет геометрии структуры в программе MOLPROBITY.

Коэффициент корреляции в прямом пространстве (ККПП) для каждого остатка (i) рассчитывался по следующей формуле:

$$ККПП_i = \frac{\sum_{x, y, z} (\rho(x, y, z)_{obs, i} - \overline{\rho(x, y, z)_{obs, i}}) \cdot \sum_{x, y, z} (\rho(x, y, z)_{obs, i} - \overline{\rho(x, y, z)_{obs, i}})}{(\sum_{x, y, z} (\rho(x, y, z)_{obs, i} - \overline{\rho(x, y, z)_{obs, i}})^2 \cdot \sum_{x, y, z} (\rho(x, y, z)_{obs, i} - \overline{\rho(x, y, z)_{obs, i}})^2)^{1/2}}, \text{ где}$$

$\rho_{obs, i}(x, y, z)$ — экспериментальное значение электронной плотности для i-го остатка в точке x, y, z , рассчитанное по формуле (4) с использованием

экспериментально определенных амплитуд структурных факторов и фаз модели; $\rho_{calc,i}(x,y,z)$ — расчетное значение электронной плотности для i -го остатка в точке x, y, z с использованием рассчитанных амплитуд структурных факторов и фаз модели. OMIT-карты электронной плотности и расчет коэффициента корреляции в прямом пространстве были использованы для валидации полученной модели.

Для идентификации пептоида HNP1 была синтезирована библиотека соединений. Для синтеза пептоидной библиотеки был применен комбинаторный метод «смешения и разделения», присоединение пептоидного остатка на каждом этапе включало реакцию ацетилирования и SN2-замещения. Для идентификации соединений, связывающихся с N17 использовался N-концевой пептид хантингтина bio-MATLEKLMKAFESLKSFQQQ. Идентификация пептоидов основывалась на той особенности библиотеки, что один шарик носителя содержит одно уникальное пептоидное соединение. Связанный bio-N20 детектировали с помощью стрептавидин-Qdot. Голубые шарики, имеющие красную кайму квантовых точек, отбирались вручную и секвенировались для определения последовательностей пептоидов. Одним из идентифицированных соединений был пептоид HNP1. Константа диссоциации была определена методом изотермальной титрационной калориметрии. Для анализа анти-агрегационных свойств пептоида клетки линии HEK293T трансфецировали конструкцией, кодирующей Htt-82Q-GFP, в культуральную среду добавляли пептоид HNP1. Спустя 48 часов после трансфекции клетки фиксировали и анализировали с помощью конфокального микроскопа. Для каждой концентрации подсчитывался процент клеток, содержащих ядерные или цитоплазматические включения Htt относительно GFP-позитивных клеток. Для анализа нейропротекторных свойств HNP1 использовались первичные кортико-стриатальные культуры, полученные от мышей дикого типа или линии YAC128. На 7-ой день культивирования (DIV) к культурам добавляли пептоид HNP1. Нейроны стриатума (DIV 19) визуализировали путем окраски антителами против белка DARPP32. Морфологию синаптических контактов анализировали в программе NeuronStudio.

Для определения внутриклеточной локализации S1R и колокализации с маркером ЭР, клетки линии HEK293T были ко-трансфецированы флуоресцентно-мечеными белками S1R-GFP (WT, R7ER8E, Δ R7-R8, 9-10insAAAA, 9-10insGGGG, W9LW11L) и mCherry-ER. Биохимическое фракционирование мембран осуществляли следующим образом: клетки HEK239T лизировали в гипотоническом буфере, после чего осаждали митохондриальную фракцию. Цитозоль отделяли от микросомальной фракции с помощью ультрацентрифугирования. Митохондрии отделяли от митохондриально-ассоциированных мембран с помощью центрифугирования в градиенте перколла. Для изучения прямого связывания эндогенного и рекомбинантного S1R с холестерином применялся метод pull-down с использованием холестерин-агарозы.

Для биофизических экспериментов рекомбинантный S1R был реконструирован в модельные бислойные мембраны. В работе использовались следующие липиды: 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин 18:1 (ДОФХ), сфингомиелины головного мозга (СМ), холестерин, 16:0-06:0 NBD-PC (NBD-ФХ).

Рекомбинатный рецептор был экспрессирован в бакуловирусной системе экспрессии, выделен и очищен до гомогенного состояния. Белок был ковалентно мечен с помощью флуорофора AlexaFluor 555. Протеолипосомы были получены путем сольubilизации липидных смесей вместе с S1R-AlexaFluor555 и последующим удалением детергента с помощью гидрофобной смолы BioBeads. Для получения «гигантских» однослойных липосом (ГОЛ) протеолипосомы наносили на предметные стекла, покрытые тонким слоем высушенной 1% агарозы, высушивали и регидрировали. ГОЛ формировались при 42° С в течение часа и анализировались с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Для FRAP-измерений коэффициентов диффузии в ГОЛ небольшую область радиусом r выжигали коротким высокоинтенсивным лазерным импульсом, после чего измеряли восстановление интенсивности флуоресценции. Кривые восстановления аппроксимировали экспоненциальной функцией для определения $\tau_{1/2}$. Коэффициент диффузии определяли, пользуясь формулой для двумерной диффузии $\tau_{1/2} = R^2 / 4D$. Для анализа контактной длины между ЭР и митохондриями применяли метод просвечивающей электронной микроскопии. Для визуализации ЭР клетки трансфецировали плазмидами HRP-ER (контроль) и S1R-Arex2 (сверхэкспрессия), соответственно. Для анализа синаптических контактов в модельной гиппокампальной культуре нейронов первичные культуры получали от мышей дикого типа и линии S1RKO. Клетки ко-трансдуцировали лентивирусными конструкциями для сверхэкспрессии S1R дикого типа или R7ER8E для сверхэкспрессии мутантного S1R (DIV 7), и конструкцией TdTomato для визуализации синапсов. Клетки анализировали на DIV 14 с помощью конфокальной микроскопии. Синапсы классифицировали в программе NeuronStudio.

В третьей и четвертой главах работы представлены результаты, полученные в настоящем диссертационном исследовании, и их обсуждение. Первый параграф посвящен определению и описанию кристаллической структуры С-концевого фрагмента атаксина-3 (Atxn3-C), который был экспрессирован в виде белка слияния с мальтозо-связывающим белком МВР. Белок был выделен и очищен до гомогенного состояния с помощью аффинной хроматографии на амилозной смоле и гель-фильтрации. Кристаллы белка были получены в двух кристаллизационных условиях. Полученные кристаллы (С1 и С2) были использованы для получения картины рентгеновской дифракции. Полученные дифрактограммы использовались для вычисления модулей структурных факторов рассеяния. Начальная фазовая информация была получена методом молекулярного замещения, в качестве поисковой модели использовалась молекула МВР. Финальные параметры R и R_{free} для уточненных моделей составили, соответственно, 0,207/0,225 (С1), 0,202/0,249 (С2) (Табл. 1). Кристаллы С1 и С2 имели разные пространственные группы (С1 — $P1$, С2 — $P14_1$), параметры элементарной ячейки и упаковку молекул в кристалле (табл. 1). Структура С-концевой области также была различной. ПолиГ тракт в кристалле С1 находился в конформации случайной петли (рис. 1 А), в то время как тот же участок в кристалле С2 частично экранирован от растворителя симметрично-связанными молекулами МВР ($x-1, y, z$) и ($x-1, y, z-1$) и находится в конформации

альфа-спирали (рис. 1 Б). Кристаллическая структура этого региона была определена с разрешением 2,2 Å. Финальные координаты моделей были приняты и депонированы в международную базу данных белковых структур PDB (C1: 4YS9, C2: 4WTH).

Наибольший интерес представляет, очевидно, структура полиглутаминовой области атаксина-3 (рис. 2). Было показано, что этот регион вовлечен в формирование как меж-, так и внутримолекулярных взаимодействий. Межмолекулярные взаимодействия представлены связями с расположенными рядом остатками МВР: карбоксильными группами остатков аспарагиновой и глутаминовой кислоты (Q387(NE2)–E22(OE2), Q389(NE2)–D95(OD2), Q394(NE2)–D236(OD2)), аминогруппами лизина (Q390(OE2)–K295(NZ), Q392(O)–Y176(OH), карбоксильными группами полипептидного остова (Q390(NE2)–D296(O)/K295(O); Q393(NE2)–T237(O) и координированными молекулами воды (Q391, Q392, Q385, Q386) (рис. 2 Г, Д, Е, Ж).

Наиболее интересные данные о структуре полиГ спирали были получены, пожалуй, при анализе внутримолекулярных взаимодействий полиГ. Альфа-спиральная конформация Atxn3-C дополнительно стабилизирована внутримолекулярными водородными связями, формируемыми между остатками глутамина и ориентированными преимущественно параллельно оси альфа-спирали (рис. 2, вкладки А, Б, В, а также табл. 2).

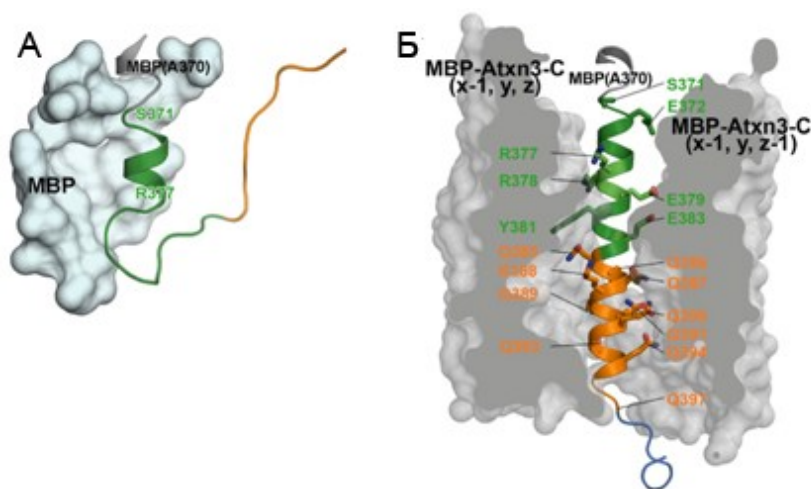


Рис. 1. Структуры Atxn3-C в кристаллах C1 и C2. А. Структура Atxn3-C в кристалле C1. Б. Структура Atxn3-C в кристалле C2. МВР показан в виде поверхности серого цвета. N-концевая фланкирующая последовательность — зеленым, полиГ тракт — оранжевым, С-концевая фланкирующая последовательность — синим цветами.

Восемь из 13 остатков вовлечены в формирование прямых внутриспиральных водородных связей между i и $i+4$ остатками (в четырех случаях) и i и $i+3$ остатками (в одном случае) (рис. 2 и табл. 2). Помимо этих прямых взаимодействий между остатками глутамина, остаток Q385 взаимодействует с неглутаминовыми остатками $i-4$ (Y381) и $i+3$ (K388) через водородные связи с координированной молекулой воды. Лишь один остаток Q392 не вовлечен во внутриспиральные взаимодействия, взаимодействуя с Y175 МВР.

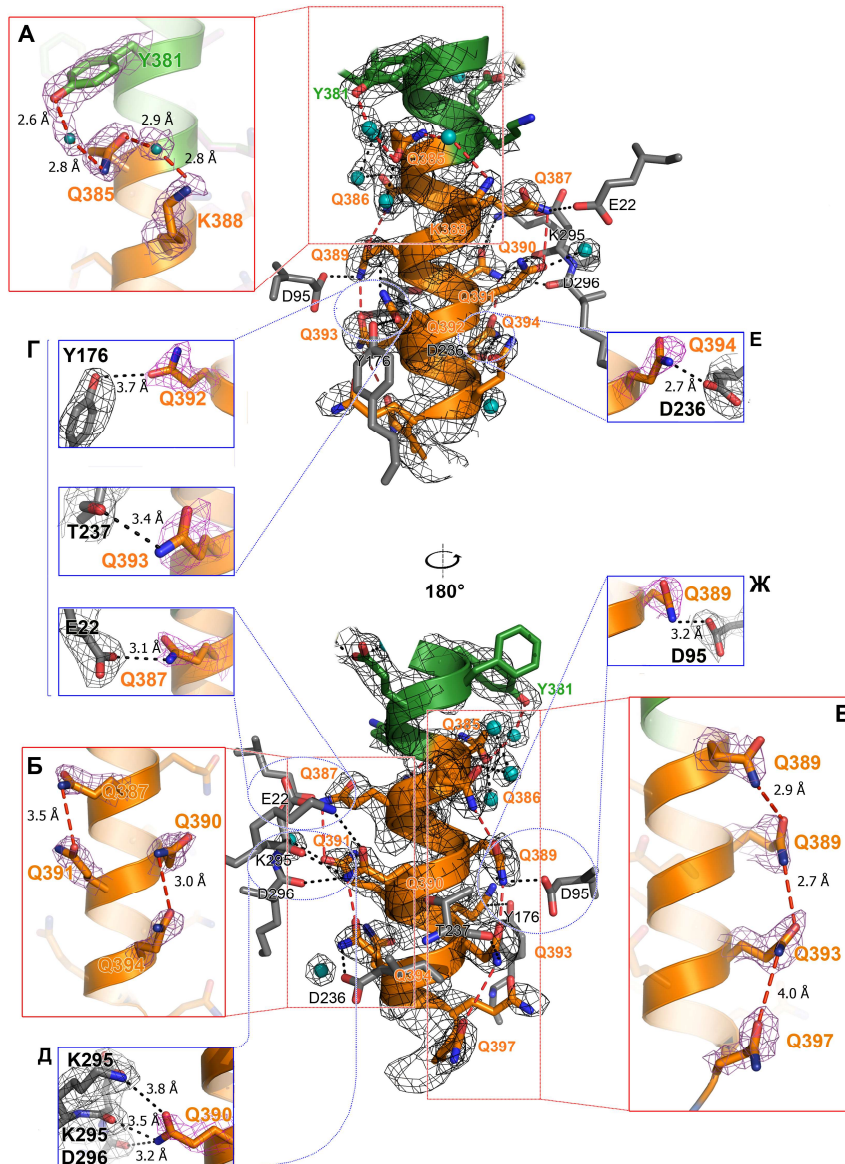


Рис. 2. Структура полиГ спирали в кристалле C2. Участок полиГ в составе МВР-Atxn3-С показан оранжевым цветом. N-концевая фланкирующая последовательность показана зеленым, а остатки МВР — серым, координированные молекулы воды — голубым цветами. Межмолекулярные водородные связи показаны черными, внутримолекулярные — красными пунктирными линиями. Карты электронной плотности $2F_o - F_c$ для Atxn3-С показаны в виде синих изоповерхностей ($1,0 \sigma$). На красных вкладках детально показаны внутриспиральные взаимодействия между остатками глутамина (с соответствующей ОМТ-картой электронной плотности $0,9 \sigma$): (А) Y381–Q385–K388; (Б) Q387–Q391 и Q390–Q394; (В) Q386–Q389–Q393–Q397. На синих вкладках детально показаны межмолекулярные взаимодействия между

остатками глутамина и остатками МВР с соответствующей ОМТ-картой ($0,9 \sigma$): (Г) Q392–Y176, Q393–T237, Q387–E22; (Д) Q390–K295/K295/D296; (Е) Q394–D236; и (Ж) Q389–D95.

Табл. 1. Кристаллографические данные, параметры съемки кристаллов, статистические характеристики уточнения кристаллических структур.

	Кристалл C2 (4WTH)	Кристалл C1 (4YS9)
Сбор дифракционных данных		
Источник	Синхротрон APS, линия 19 ID (Аргонн, США)	
Длина волны (Å)	0,9795	
Температура (К)	100	
Детектор	Quantum 315r	
Пространственная группа	<i>P1</i>	<i>P14₁</i>
Параметры элементарной ячейки		
<i>a, b, c</i> (Å)	49,01, 59,77, 77,79	59,68, 59,68, 135,17
α, β, γ (°)	90,00, 89,99, 87,50	90,00, 90,00, 90,00
Область разрешения (Å)	38,74–2,25 (2,33–2,25)*	37,65–2,00 (2,05–2,00)*
Количество независимых отражений	39 115	31 861
<i>R</i> _{sym}	0,047 (0,917)	0,053 (0,566)

Среднее значение $I/\sigma I$	15,7 (1,2)	23,2 (1,2)
Полнота набора (%)	94,0 (76,1)	85,2 (58,0)
Избыточность набора данных	1,9 (1,8)	1,9 (1,3)
Уточнение структуры		
Область разрешения (Å)	38,74–2,25 (2,33–2,25)	37,65–2,00 (2,05–2,00)
Количество отражений, общий набор данных	37158 (2105)	30210 (2205)
Количество отражений, тестовый набор данных	1980 (113)	1607 (124)
R_{work}	0,202 (0,541)	0,207 (0,221)
R_{free}	0,249 (0,591)	0,225 (0,327)
Количество неводородных атомов		
Белка	6295	2975
Лиганда/ионов	7 (Zn), 46 (MAL)	4 (Zn), 23 (MAL)
Воды	155	90
Средние тепловые B-факторы (Å ²)		
Белка	44,7	45,4
Лиганда/ионов	61,7 (Zn), 33,4 (MAL)	59,8 (Zn), 30,5 (MAL)
Воды	40,0	39,4
Среднеквадратичные отклонения		
Длин связей (Å)	0,007	0,006
Углов связей (°)	1,131	1,043
Статистика Рамачандрана		
Наиболее предпочтительная область (%)	98,12	96,60
Разрешенная область (%)	1,75	2,88
Запрещенная область (%)	0,13	0,52

* – значения в скобках соответствуют сфере наиболее высокого разрешения.

Табл. 2. Внутриспиральные водородные связи между остатками глутамина в регионе полиГ кристалла С2.

А.к.о.	А.к.о.	Расстояние, Å	А.к.о.	А.к.о.	Расстояние, Å
Y381 (OH)	Q385 (OE1)	Y381–НОН; 2,6; НОН–Q385: 2,8	Q389 (NE2)	Q393 (OE1)	2,7
Q385 (NE2)	K388 (NZ)	Q385–НОН: 2,9; НОН–K388: 2,8	Q390 (NE2)	Q394 (OE1)	3,0
Q387 (NE2)	Q391 (OE1)	3,5	Q393 (NE2)	Q397 (OE1)	4,0
Q386 (NE2)	Q389 (OE1)	2,9			

Две кристаллические структуры показали, что полиГ тракт находится в двух конформациях: свободной петли и альфа-спирали, что согласуется с ранее полученными кристаллическими структурами первого экзона хантингтина. В исследованиях Htt было показано, что полиГ тракт способен принимать целый спектр различных переходных между спиралью и петлей структур. Конформационная гетерогенность, наблюдавшаяся для кристаллов Htt, проявила себя как два типа кристаллов Atxn3-C. Наша гипотеза состоит в том, что полиглутаминовый тракт Htt и Atxn3 находится в конформационном равновесии между альфа-спиральной структурой и структурой случайной петли.

Далее приводится сравнение установленной экспериментальной структуры с другими работами, посвященными исследованиям последовательностей полиГ. Внутримолекулярная стабилизация структуры полиГ была описана в ряде теоретических работ, но впервые наблюдалась экспериментально. В модели, предложенной Lathrop и коллегами, боковые остатки глутамина вовлечены в формирование межостаточных водородных связей между остатками i и $i+4$. Кристаллическая структура полиГ в кристалле C2 показывает, что остатки глутамина способны формировать водородные связи как с $i+4$, так и с $i+3$ остатками. Согласно экспериментально определенной кристаллической структуре, остатки глутамина более склонны к гомотипическим Q-Q взаимодействиям, формируя большое количество межостаточных водородных связей. Таким образом, полиГ участок в альфа-спиральной конформации представляется инертным с точки зрения белок-белковых взаимодействий.

В заключении параграфа, автором рассматривается структура полиГ в контексте нейродегенеративных заболеваний. В структуре MBP-Atxn3-C остатки глутамина формируют множественные координированные водородные связи вдоль полиглутаминовой спирали. М. Перутц был первым, кто предложил модель олигомерной бета-складчатой структуры полиГ, известную, как полярная застежка. Согласно этой модели, Q-Q взаимодействия стабилизируют бета-складчатую конформацию полиглутаминовых агрегатов. *Структура Atxn3-C и модель полярной застежки демонстрируют, как Q-Q взаимодействия стабилизируют вторичные белковые структуры.* Эффект стабилизации альфа-спиральной структуры полиглутамина, по-видимому, будет гораздо менее выражен в присутствии сольватирующих молекул воды. Однако, в тех случаях, когда эффект влияния растворителя будет менее выражен, как, например, при увеличении локальной концентрации белка вследствие экспансии триплета или при аккумуляции полиглутаминовых фрагментов, эффект Q-Q стабилизации может приводить к формированию полиглутаминовых агрегатов. Исключение растворителя может приводить к ассоциации глутамина, посредством как внутри- так и межмолекулярных взаимодействий, осложняя протеасомную деградацию агрегатов подобных олигомеров и ускоряя макро-агрегацию полиглутамин-содержащих белков.

Во втором параграфе третьей главы описывается синтез пептоидной библиотеки и идентификация нового пептоидного соединения HNP1, которое специфически связывается с N-концевой областью хантингтина. На первом этапе была синтезирована библиотека, насчитывающая порядка 60000 уникальных соединений (рис. 3 А).

С использованием пептида bio-N20 в качестве мишени, было идентифицировано и синтезировано пептоидное соединение HNP1, специфически связывающееся с N-концевой областью хантингтина (рис. 3 Б). Было показано, что HNP1 связывается с рекомбинантным хантингтином MBP-Htt-17Q и MBP-Htt-45Q, но не с MBP (рис. 3 В). Методом изотермической титрационной калориметрии была определена константа диссоциации пептоида и N17 ($K_d=20$ мкМ).

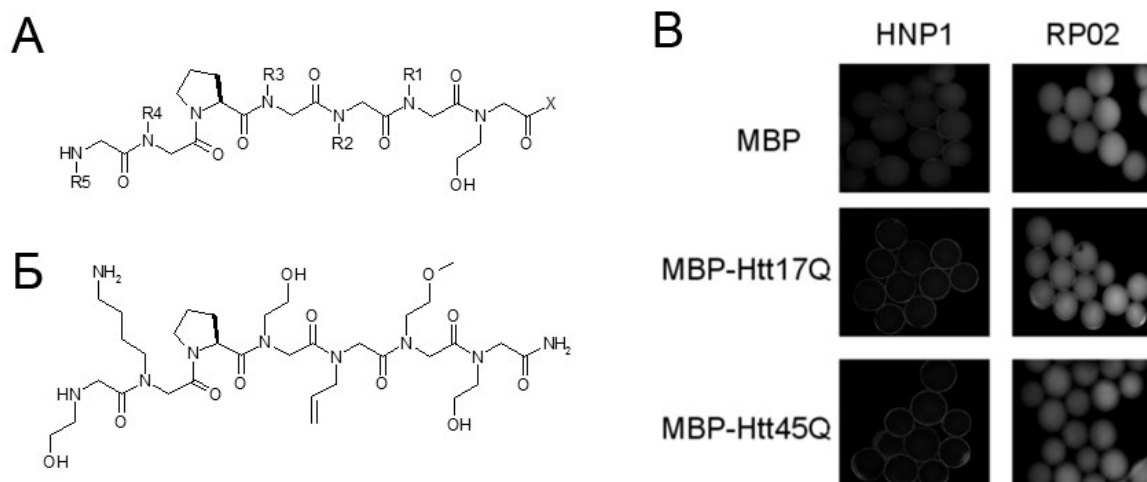


Рис. 3. Идентификация пептоида HNP1, специфически связывающегося с N-концевой областью хантингина. А. Общая химическая структура пептоидной библиотеки. Б. Химическая структура HNP1. В. Связывания пептоида HNP1 с рекомбинантным хантингином MBP-Htt-17Q и -45Q.

Для анализа антиагрегационных свойств пептоида HNP1 *in vitro* в клетках линии HEK293T был экспрессирован флуоресцентно-меченый хантингин Htt-82Q-GFP. Было показано, что добавление HNP1 концентрационно-зависимо уменьшает количество клеток, содержащих ядерные или цитоплазматические агрегаты мутантного хантингина Htt-82Q-GFP (рис. 4 А). В заключении, на модельной первичной кортико-стриатальной культуре нейронов, полученной от мышей линии YAC128, экспрессирующих мутантный хантингин, было показано, что добавление соединения оказывает нейропротекторный эффект и стабилизирует синаптические контакты нейронов стриатума (рис. 4 Б).

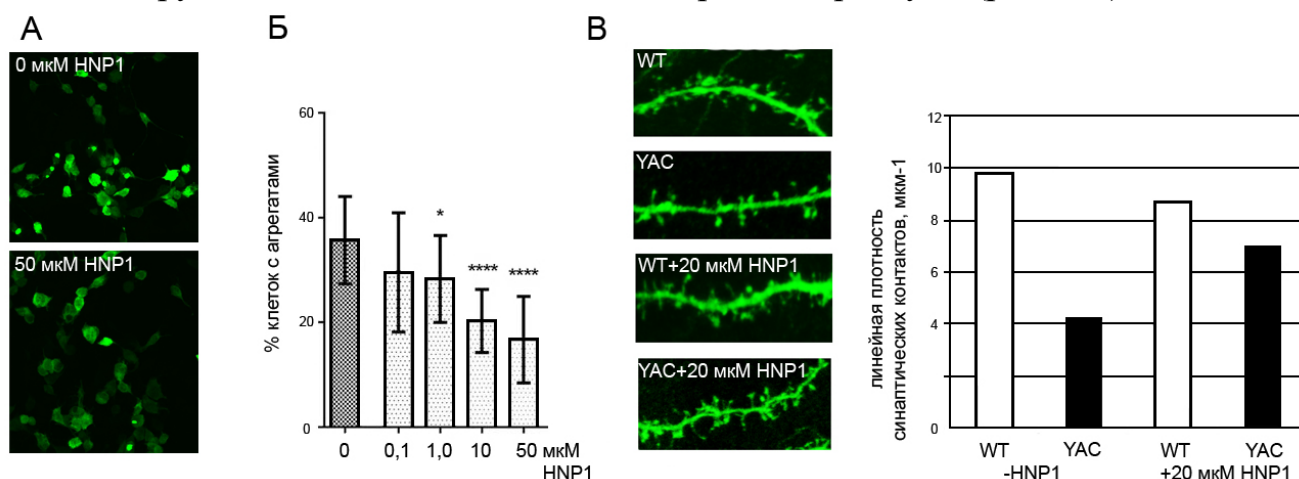


Рис. 4. Агрегация флуоресцентно-меченого хантингина *in vitro* и нейропротекторные свойства пептоида HNP1. А. и Б. Процент клеток содержащих ядерные или цитоплазматические агрегаты Htt82Q-GFP в присутствии соответствующих концентраций HNP1. В. Изображения дендритов клеток стриатума (окраска антителами против DARPP32) и количественный анализ линейной плотности дендритных шипиков в культурах дикого типа и YAC128 в присутствии и отсутствии HNP1.

В обсуждении полученных результатов рассматриваются свойства, которые делают пептоиды привлекательными с фармакологической точки зрения. Пептоиды рядом преимуществ по сравнению с традиционными пептидными соединениями. В частности, они (1) обладают более высоким разнообразием по

сравнению с пептидами; (2) вследствие наличия модифицированной пептидной связи не способны расщепляться протеазами, что выражается в более высокой стабильности пептоидов *in vivo*; (3) короткие пептоиды являются мембранопроницаемыми. Таким образом, полученные в настоящей работе соединения-прототипы могут служить основой для дальнейшей разработки пептоидных препаратов в сфере нейродегенерации в целом, и, в частности, терапии БХ.

Третий параграф третьей главы посвящен изучению белок-липидных взаимодействий рецептора сигма-1 человека. В культуре клеток НЕК293Т было показано, что S1R-GFP локализуется в особых областях ЭР (рис. 5 А). С помощью биохимического фракционирования было показано, что рецептор дикого типа находится, преимущественно, в составе ассоциированных с митохондриями мембран (МММ) (рис. 5 В и Г — коэффициенты распределения между МММ и микросомальной фракциями). С помощью биоинформатического анализа первичной аминокислотной последовательности рецептора, в составе трансмембранного участка был идентифицирован предполагаемый сайт связывания холестерина, представляющий собой CARC-последовательность вида K/R-X(1-5)-Y/F/W-X(1-5)-L/V (H₂N-MQWAVGRRWAWAALLLAVAAVLTQV VWLWLGT..., подчеркнут трансмембранный участок). Мутации по данным аминокислотным остаткам (R7E/R8E, ΔR7-R8, W9L/W11L, 9-10insGGGG, 9-10insAAAA) приводили к перераспределению рецептора из МММ в тубулярный ЭР (рис. 5 Б). С помощью биохимического фракционирования мембран было показано, что мутант R7E/R8E находится как в МММ, так и в тубулярном ЭР (рис. 5 В и Г). Наконец, в экспериментах pull-down было продемонстрировано, что как рекомбинантный, так и эндогенный рецептор специфично связывается с холестерином-агарозой (рис. 5 Д). Таким образом, было показано, что белок-липидные взаимодействия, а именно, связывание с холестерином, определяют внутриклеточную локализацию S1R, и, вероятно, могут играть важную роль в функционировании рецептора сигма-1.

Известно, что определенные контактные области ЭР, включая МММ, характеризуются особым липидным составом и представлены липидными рафтовыми микродоменами. Для прямых биофизических исследований *in vitro* была разработана методика реконструкции рекомбинантного рецептора сигма-1 человека в модельные бислойные мембраны. Рекомбинантный флуоресцентно-меченый рецептор использовался для встраивания в липосомы и получения «гигантских» одномембранных липосом (ГОЛ). Как видно из полученных результатов (рис. 6, верхняя панель), сигма-1 рецептор равномерно распределен на поверхности ГОЛ, полученных из липида ДОФХ. Для получения липосом другого липидного состава использовались смеси ДОФХ с холестерином. В данном случае наблюдалась кластеризация рецептора в определенных областях липидного бислоя и соответствующее уменьшение интенсивности плотности диффузно-распределенного рецептора.

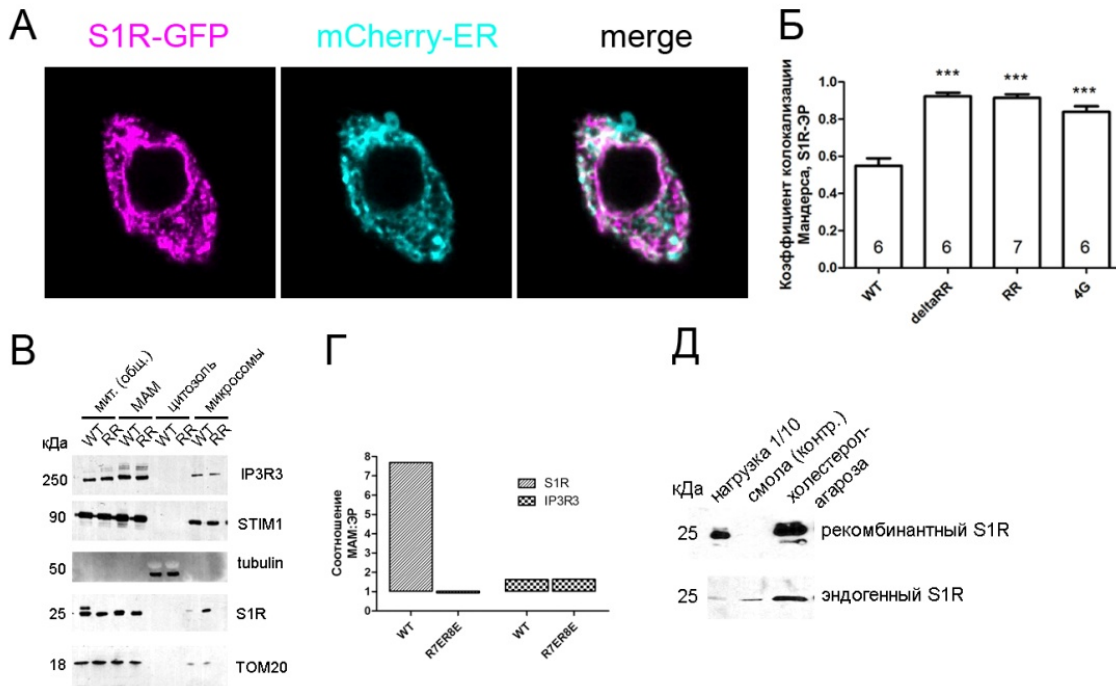


Рис. 5. S1R локализуется в особых областях ЭР (MAM), что определяется его способностью связываться с холестерином. А. Флуоресцентная микроскопия, показывающая внутриклеточную локализацию S1R (S1R-GFP и маркер ЭР mCherry-ER). Б. Коэффициенты колокализации Мандерса для рецептора дикого типа и мутантов по сайту связывания с холестерином и mCherry-ER. В. Результаты биохимического фракционирования мембран и распределение рецептор дикого типа и мутанта R7ER8E (RR). Г. Количественный анализ Вестерн-блота на рис. В. Д. Связывание эндогенного и рекомбинантного S1R с холестерин-агарозой.

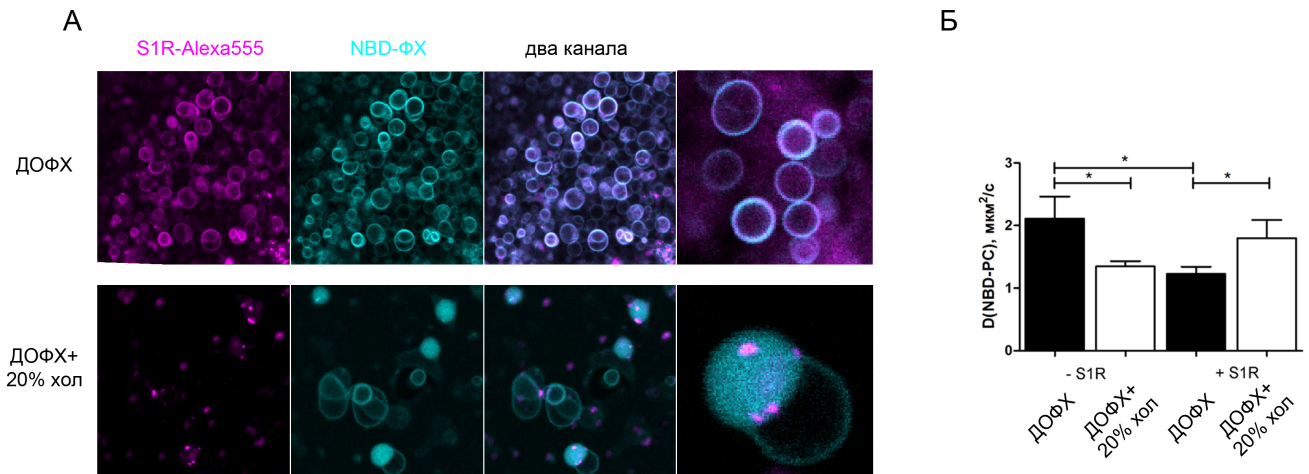


Рис. 6. Реконструкция рецептора сигма-1 в «гигантские» одномембранные липосомы различного липидного состава. А. Верхняя панель: реконструкция рецептора в липосомы, полученные из липида ДОФХ. Нижняя панель: реконструкция рецептора в липосомы, содержащие 20% холестерин (S1R-Alexa555, NBD-PC). Б. FRAP-измерения коэффициентов диффузии метки NBD-PC в липосомах различного состава в присутствии и отсутствии S1R.

Опираясь на полученные ранее биохимические данные по связыванию рецептора с холестерином, было предположено, что кластеризация рецептора приводит также к соответствующему перераспределению холестерина в составе ГОЛ и формированию холестерин-богатых липидных микродоменов. Для определения коэффициентов диффузии использовался метод FRAP. При увеличении концентрации холестерина наблюдалось уменьшение коэффициента диффузии, что соответствует увеличению вязкости мембраны в присутствии

холестерина (рис. 6 Б). Встраивание рецептора сигма-1 также приводило к понижению коэффициента диффузии мембранных липидов, поскольку белок представляет собой препятствие для свободной диффузии метки. В соответствии с исходным предположением о сигма-1-опосредованном перераспределении мембранных липидов, встраивание рецептора в холестерин-содержащие липосомы приводило к обратному эффекту, то есть наблюдалось увеличение коэффициента диффузии метки (в данном эксперименте изучались области, свободные от кластеризованного рецептора). Таким образом, был сделан вывод, что рецептор сигма-1 в модельной системе кластеризуется в определенных областях липидной мембраны, секвестрируя холестерин, что приводит к соответствующему уменьшению эффективной концентрации холестерина в свободном от S1R бислое и увеличению эффективной концентрации холестерина в S1R-богатых липидных кластерах.

На клеточной линии НЕК293Т было показано, что сверхэкспрессия рецептора приводит к увеличению контактной длины ЭР-митохондрии (рис. 7 А). В модельных нейрональных культурах было продемонстрировано, что мутантная форма белка R7E/R8E не может компенсировать утраченную функцию рецептора дикого типа по поддержанию синаптических контактов *in vitro* (рис. 7 Б). Полученные данные позволяют выдвинуть обоснованную гипотезу о том, что S1R является организатором и стабилизатором рафтовых микродоменов ЭР.

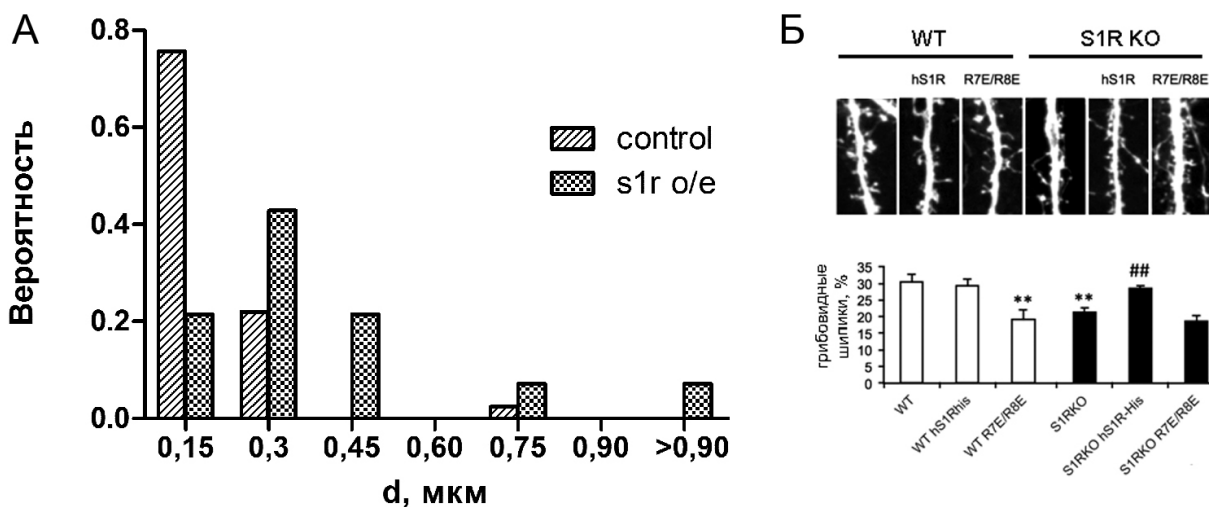


Рис. 7. Функциональное значение рецептора сигма-1. А. Увеличение контактной длины между ЭР и митохондриями при сверхэкспрессии S1R. Б. Функционально-активный рецептор дикого типа необходим для поддержания синаптических контактов в модельной гиппокампальной культуре нейронов.

В заключении главы формулируется гипотеза о S1R-опосредованном механизме регулирования ионных каналов через белок-липид-белковые взаимодействия. Последовательность событий в присутствии рецептора сигма-1 в мембране может быть графически проиллюстрирована на рис. 8. Рафт-организующая функция рецептора может оказывать прямое и опосредованное влияние на локализацию, функцию и позиционирование рафтовых и нерафтовых белков, что, в целом, позволяет объяснить экспериментально задокументированную «многофункциональность» S1R.

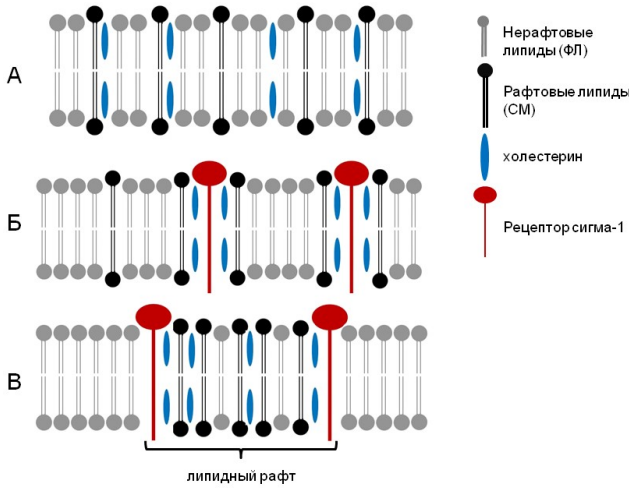


Рис. 8. S1R в роли организатора и стабилизатора липидных рафтов ЭР. А. В случае, если концентрация холестерина в мембране недостаточна для возникновения фазового разделения, фосфолипиды, сфингомиелины и холестерин гомогенно распределены в бислое. Б. В присутствии S1R наблюдается кластеризация рецептора и холестерина, что приводит к увеличению локальной (эффективной) концентрации холестерина. В. Увеличение локальной концентрации холестерина приводит к фазовому переходу и разделению фаз на L_o (рафтовую) и L_d (нерафтовую).

Существующие литературные данные показывают, что отсутствие S1R приводит к глобальным перестройкам в мембранном составе на клеточном уровне. Рецептор сигма-1 функционирует, по-видимому, за счет перераспределения холестерина (и, возможно, других типов липидов) между свободной от холестерина жидкой липидной фазой и рафтовой фазой ЭР, стабилизируя последнюю, тем самым дифференциально и разнонаправленно регулируя мембранные каналы и рецепторы.

Выводы

1. Согласно экспериментально установленной с помощью метода рентгеноструктурного анализа структуре С-концевой области атаксина-3, полиглутаминовый тракт находится в двух конформациях: свободной петли (кристалл С1) и альфа-спирали (кристалл С2).

2. Структурной особенностью полиглутаминового тракта в альфа-спиральной конформации является то, что она стабилизирована двумя сетями водородных связей: между атомами пептидной группы i и $i + 4$ остатков и между карбокси- и аминогруппами боковых цепей остатков глутамина; при этом водородные связи между боковыми цепями ориентированы параллельно оси альфа-спирали.

3. Вновь разработанное пептоидное соединение HNP1 связывается с N-концевой областью хантингтина с микромолярной аффинностью ($K_d=20$ мкМ).

4. В микромолярных концентрациях HNP1 ингибирует агрегацию мутантного хантингтина в клетках линии HEK293T (снижение в 2,2 раза, $p<0.0001$). HNP1 является нейропротектором в кортико-стриатальной модели болезни Хантингтона, восстанавливая плотность дендритных шипиков нейронов.

5. Реконструированный S1R равномерно распределен на поверхности «гигантских» одномембранных липосом, полученных из липида ДОФХ, и кластеризуется в двухкомпонентной липидной смеси, содержащей холестерин.

6. С помощью метода FRAP показано, что встраивание рецептора в холестерин-содержащие «гигантские» липосомы приводит к увеличению диффузии метки (увеличение коэффициента диффузии в 1,5 раза, $p=0.055$), что свидетельствует о S1R-опосредованном перераспределении холестерина в модельных мембранах.

7. С помощью методов флуоресцентной микроскопии и биохимического фракционирования показано, что рецептор сигма-1 локализуется в особых областях эндоплазматического ретикулула, что обусловлено наличием аминокислотных CARC-последовательностей, связывающих холестерин. Мутации по критическим аминокислотным остаткам приводят к неправильному позиционированию рецептора в клетке.

8. Сверхэкспрессия рецептора на клеточном уровне приводит к увеличению контактной длины между ЭР и митохондриями в клетках линии НЕК293Т. Функционально-активный рецептор необходим для поддержания нормальной плотности синаптических контактов в гиппокампальных культурах нейронов *in vitro*.

Заключение. В настоящей работе с помощью спектра биофизических, структурных и функциональных исследований был решен ряд фундаментальных проблем, касающихся структурной организации белков, вовлеченных в развитие нейродегенеративных заболеваний. С помощью метода рентгеноструктурного анализа определена структура С-концевой области атаксина-3, включающей полиГ тракт, с наиболее высоким доступным на настоящий момент разрешением в 2 Å. Определенная вторичная структура подтвердила полученные ранее структурные данные о белке хантингтине, а также предоставила новые данные о внутри- и межмолекулярных взаимодействиях полиГ тракта. Из пептоидной библиотеки было идентифицировано новое соединение HNp1, связывающееся с N-концевой областью хантингтина и обладающее антиагрегационными и нейропротекторными свойствами *in vitro*. Была сформулирована гипотеза о белок-липид-белковом механизме функционирования S1R через стабилизацию липидных микродоменов, и впервые были представлены экспериментальные биофизические данные в пользу того, что рецептор сигма-1 является рафтовым организатором ЭР.

Список публикаций по теме исследования

Статьи

1. Пчицкая Е.И., Жемков В.А., Безпрозванный И.Б. Динамические микротрубочки при болезни Альцгеймера: связь с патологией дендритных шипиков // Биохимия. – 2018. – Т. 83(9). – С. 1343–1350. DOI 10.1134/S0320972518090087.

2. Zhemkov V.A., Kulminskaya A.A., Bezprozvanny I.B., Kim M. The 2.2-Angstrom resolution crystal structure of the carboxy-terminal region of ataxin-3 // FEBS Open Bio. – 2016. – Т. 3, No 6. – С. 168–178. DOI: 10.1002/2211-5463.12029.

3. Большакова А.В., Куканова Е.О., Гайнуллина А.Н., Жемков В.А., Корбан С.А., Безпрозванный И.Б. Рецептор сигма-1 как потенциальная фармакологическая мишень при лечении нейропатологии // Научно-технические ведомости Санкт-Петербургского государственного политехнического университета. Физико-математические науки. – 2016. – Т. 1(237). – С. 48-65. DOI: 10.5862/JPM.237.5.

Материалы конференций

4. Жемков В.А. Корбан С.А., Кульминская А.А., Безпрозванный И.Б., Ким М. Белок-липидные взаимодействия рецептора сигма-1 человека // XIX Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии ФГБУ «ПИАФ» НИЦ «Курчатовский институт». Сборник тезисов. – 2018.

5. Корбан С.А., Жемков В.А., Кульминская А.А., Безпрозванный И.Б., Ким М.В.. Сигма-1 рецептор – новая мишень при нейропатологиях. Структура и функция // Acta Naturae, Спецвыпуск. Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения

памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VIII российский симпозиум «Белки и пептиды». М.: Издательство «Перо». – 2017. – С. 113.

6. Корбан С.А., **Жемков В.А.**, Кульминская А.А., Безпрозванный И.Б., Ким М.В. Лиганд-индуцированные структурные изменения сигма-1 рецептора человека. Корбан С.А., Жемков В.А., Кульминская А.А., Безпрозванный И.Б., Ким М.В. В сборнике: Неделя науки СПбПУ материалы научной конференции с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций. Санкт-Петербург. – 2017. – С. 473-476.

7. **Жемков В.А.**, Кульминская А.А., Безпрозванный И.Б., Ким М.В. Исследование протекторного механизма анти-агрегационного хантингтин-связывающего пептоида HNP1. Неделя Науки СПбПУ: Материалы научной конференции с международным участием. Институт Физики, Нанотехнологий и Телекоммуникаций. – 2016. – С. 436-437.

8. Bolshakova A.V., **Zhemkov V.A.**, Gainullina A.N., Kukanova E.O., Korban S.A., I.B. Bezprozvanny. Sigma-1 Receptor is a Potential Drug Target for Neuropathology Treatment // Opera Medica at Physiologica – 2016. – Т. 2(S1). – С. 85-86.

9. **Жемков В.А.**, Кульминская А.А., Безпрозванный И.Б., Ким М.В. Особенности структурной организации полиглутаминового тракта белка атаксина-3 // Неделя Науки СПбПУ: Материалы научного форума с международным участием. Институт Физики, Нанотехнологий и Телекоммуникаций. – 2015. – С. 435-436.

10. **Zhemkov VA**, Kulminskaya AA, Bezprozvanny IB, Kim M. Crystal structure of the ataxin-3 carboxy terminal region. Neurodegenerative diseases. – 2015. – Т. 15 (S1). – С. 1659.

11. **Жемков В.А.**, Кульминская А.А., Безпрозванный И.Б., Ким М.В. Кристаллические структуры полиглутаминового тракта белка атаксина-3 // Неделя Науки СПбПУ: Материалы научно-практической конференции. Институт Физики, Нанотехнологий и Телекоммуникаций СПбПУ. – 2015. – С. 417-418.

12. **Жемков В.А.**, Кульминская А.А., Безпрозванный И.Б., Ким М.В. Структурные особенности полиглутаминового тракта атаксина-3. V Съезд Биофизиков России. Материалы докладов. – 2015 – Т. 1. – С. 84.

13. Корбан С.А., **Жемков В.А.**, Кульминская А.А., Безпрозванный И.Б., Ким М.В. S-1 рецептор как новая терапевтическая цель при нейродегенеративных заболеваниях. Экспрессия, выделение и очистка s-1 рецептора человека для структурно-функциональных исследований // Неделя Науки СПбПУ: Материалы научного форума с международным участием. Институт Физики, Нанотехнологий и Телекоммуникаций. – 2015. – С. 444-445.

14. **Жемков В.А.**, Корбан С.А., Кульминская А.А., Безпрозванный И.Б., Ким М.В. Гетерологическая экспрессия, выделение и очистка сигма-1 рецептора человека. // II Конференция молодых ученых и специалистов ПИЯФ. Сборник докладов. – 2015. – С. 54.

15. **Zhemkov V.A.**, Vali S., Kulminskaya A.A., Vlasova O.L., Bezprozvanny I.B. and Kim M.W. Crystallization of Biotinylated Huntingtin N17 Domain with Streptavidins. // International Scientific Conference Science of the Future. – 2014. – abstract online <http://www.p220conf.ru/abstracts/download/2-life/334-v-zhemkov>.

16. **Zhemkov V.A.**, Vali S., Gagarskaya Y.A., Kulminskaya A.A., Vlasova O.L., Bezprozvanny I.B., Kim M.W. Co-crystallization of streptavidin with biotinylated huntingtin N17 domain. // Calcium 2014: From basics to bedside. – 2014. – С. 5.

17. **Жемков В.А.**, Власова О.Л. Определение структуры N-концевого участка белка хантингтина в комплексе с пептоидным лигандом HNP1. // XLII научно-практическая конференция с международным участием «Неделя науки СПбПУ». Сборник Института физики, нанотехнологий и телекоммуникаций. – 2013. – Т. 2. – С. 185-7.

18. **Жемков В.А.**, Дрожжина Т.А., Ким М.В., Вали Ш., Безпрозванный И.Б. Структура N-терминального конца хантингтина в комплексе с пептоидом HNP1. // Всероссийская конференция «Системно-технические решения проблем визуализации в нейродегенерации». Сборник тезисов. – 2013. – С. 4-8.

19. Drozhzhina T., **Zhemkov V.**, Vali S., Jimin P., Grishin N., Bezprozvanny I., Kim M.W. Structure of Huntingtin N-terminal region in complex with designed protein ligands. // 18th International Conference on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease. Сборник тезисов. – 2013. – С. 20.