Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций

На правах рукописи

ЖЕМКОВ Владимир Андреевич

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

Направление подготовки 03.06.01 – Физика и астрономия

Направленность 03.06.01_12 – Биофизика

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах научно-квалификационной работы (диссертации)

Автор работы: Жемков Владимир Андреевич Научный руководитель: д.б.н. Безпрозванный Илья Борисович

Санкт Петербург – 2018

Работа выполнена на базе лаборатории молекулярной нейродегенерации кафедры кафедре «Медицинская физика» Института физики, нанотехнологий и телекоммуникаций федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

Зав. кафедрой: Власова Ольга Леонардовна, д.ф.-м.н., проф.

Научный руководитель: Безпрозваннный Илья Борисович, д.б.н., заведующий лабораторией молекулярной нейродегенерации ФГАОУ ВО «СПбПУ»

Рецензент: Коневега Андрей Леонидович, к.ф.-м.н., заведующий Лабораторией биосинтеза белка федерального государственного бюджетного учреждения «Петербургский институт ядерной физики им.Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» - ПИЯФ).

Общая характеристика работы

Актуальность работы

заболевания (НДЗ) Нейродегенеративные представляют собой совокупность различных по своей природе болезней ЦНС, поражающих различные отделы головного мозга. Манифестация НДЗ происходит, как правило (за исключением редких ювенильных форм), в зрелом возрасте и на клеточном уровне связана с нейрональной клеточной гибелью И дегенерацией отдельных структур головного мозга. Многие наследственные НДЗ относят к так называемым конформационным болезням - группе основе дегенеративных заболеваний, которых лежит нарушение В трехмерной пространственной укладки определенных белковых молекул, которое сопровождается изменением конформации белков. Несмотря на многолетние исследования механизмов различных НДЗ, таких как болезни Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона, поиск эффективных И терапевтических подходов, подавляющее большинство из них остаются пациентам может быть предложено неизлечимыми. а только симптоматическое лечение. Остаются плохо изученными структурные особенности и молекулярные механизмы функционирования и активации как мутантных форм белков, нормальных, вовлеченных так И В нейродегенеративные процессы. Известно, что многие белки, вовлеченные в конформационные заболевания, формируют внутриклеточные агрегаты (гомополимеры) и/или аберрантные взаимодействия другими с макромолекулами ДНК, (белками, липидными мембранами). Для максимально полного понимания механизмов функционирования подобных белков. лежащих основе молекулярного патогенеза заболеваний, В необходимо исследований, сочетаюших применение комплексных 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 *ATXN3* которого приводит к возникновению спиномозжечковой атаксии 3-го типа, относится к белкам, содержащим гомополимерные полиглутаминовые последовательности (полиГ). Атаксин-3 является мультидоменным белком, состоящим из N-концевой области представленной каталитическим Джозефин-доменом, нескольких тандемных убиквтин-связывающих повторов и С-концевой области, содержащей полиглутаминовый тракт. Структуры Джозефин-домена и убиквитин-связывающих мотивов были ранее определены с помощью методов рентгеноструктурного анализа (PCA) и ЯМР, в то же время, структура С-концевой области не была ранее определена. Более того, имеющаяся до настоящего момента точная структурная информация о полиГ

последовательности ограничена лишь кристаллическими структурами первого экзона хантингтина (Htt) с 17 и 36 повторами глутамина, а также кристаллической структурой 10Г олигопептида в комплексе с анти-полиГ антителом. Однако, структура первого экзона хантингтина была определена с разрешением лишь 3.0 – 3.6 Å и осложнена наличием множественных конформаций полиГ в кристалле, что затруднило определение положений боковых цепей аминокислотных остатков. Таким образом, важным направлением структурных исследований белков, содержащих полиГ последовательности, является определение кристаллической структуры полиГ.

Хантингтин (Htt), является, пожалуй, одним из наиболее детально охарактеризованных, со структурной точки зрения, белков, вовлеченных в процессы НДЗ. Мутации экспансии триплета в гене хантингтина приводят к болезни Хантингтона (БХ). Структура развитию полноразмерного хантингтина была определена метом криоэлектронной микроскопии, а структуры первого экзона - с помощью РСА. Ряд структурных и биофизических работ, объектом исследования которых служил первый экзон хантингтина, продемонстрировали, что полиглутамин и фланкирующие его последовательности оказывают реципрокное влияние друг на друга: фланкирующие домены модулируют структуру полиГ тракта, его способность к агрегации и цитотоксичность. В частности, ранее было что N-концевая последовательность, показано, непосредственно предшествующая полиГ тракту (N17), является про-агрегационной. Согласно гипотезе, амфипатическая спираль N17 хантингтина гомоолигомеризуется, что, в свою очередь, приводит к сближению и увеличению локальной концентрации полиГ и последующей полиГ-опосредованной агрегации. В соответствии с этим, анти- и интратела, выработанные против N17, показали эффективность на клеточных И мышиных свою моделях болезни Хантингтона. терапевтическая ценность подобного Однако, подхода, вследствие большого молекулярного веса белковых антител, является спорной. образом, поиск небольших химических Таким соединений, блокирование N17-зависимого направленных на этапа агрегации, представляется перспективным подходом для будущей разработки веществпрототипов лекарственных средств.

Рецептор сигма-1 человека (sigma-1 receptor, S1R) является трансмембранным белком эндоплазматического ретикулума, селективно связывающим широкий спектр соединений, известных, как сигма-лиганды. Ряд агонистов рецептора сигма-1 человека в настоящее время широко используется в клинической практике для лечения нейропсихиатрических расстройств. Доклинические и клинические испытания агонистов S1R показали эффективность фармакологической активации рецептора в ряде нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Хантингтона и болезнь Альцгеймера. Согласно доминирующей на настоящий момент гипотезе, S1R

функционирует как регуляторный белок, являясь дополнительным аллостерическим модулятором широкого спектра ионных каналов И мембранных рецепторов. Рецептор сигма-1 представляется плюрипотентным модулятором, оказывая влияние на множество внутриклеточных процессов и, в целом, является анти-апоптотическим белком в условиях клеточного стресса. Таким образом, механизм функционирования S1R на молекулярном уровне остается неизвестным. Отдельную интересную область исследований представляет изучение взаимодействий S1R с липидами биологических мембран. Несмотря на ранее описанные в литературе последовательности связывания S1R с отдельными типами липидов (холестерином И ганглиозидами), белок-липидные взаимодействия S1R и функциональные эффекты подобного рода взаимоотношений на настоящий момент не изучены 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 С-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 НЕК293Т и первичных культурах нейронов.

Научная новизна работы

Впервые установлена кристаллическая структура С-концевой области атаксина-3 и полиглутаминового тракта 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 (между является наличие двух сетей водородных связей атомами между боковыми цепями полипептидного остова и аминокислотных библиотека остатков). Синтезирована пептоидных соединений И HNP1, идентифицировано пептоитоидное соединение специфически областью связывающееся (N17) хантингтина. с амино-концевой Продемонстрировано, что вещество HNP1 обладает анти-агрегационными свойствами *in vitro*, подавляя агрегацию белка слияния Htt-82Q-GFP в линии HEK239T. Показано, что вещество клетках обладает нейропротекторными свойствами в клеточной кортико-стриатальной модели болезни Хантингтона. Для рецептора сигма-1 человека показано, что он способен связываться с главными липидными компонентами рафтовых холестерином и сфингомиелинами. микродоменов: Рецептор сигма-1 человека впервые реконструирован был 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 трансмембранного Приведены составе домена. экспериментальные доказательства того, что наличие стерол-связывающего мотива отвечает за правильное позиционирование S1R в митохондриально-ассоциированные области ЭР. Продемонстрировано увеличение контактной длины между ЭР и митохондриями при свехэкспрессии S1R человека в лини HEK293T. Показано, что функционально-активный рецептор сигма-1 необходим для поддержания синаптических контактов в гиппокампальных культурах in vitro.

Теоретическая и практическая значимость работы

Представленные данные имеют фундаментальное и практическое значение. Установленная структура полиГ тракта высокого разрешения представляет собой новые данные, объясняющие поведение и фолдинг последовательностей гомополимерных полиГ. Впервые показана эффективность применения пептоидных молекул, связывающихся аминоконцевой областью хантингтина, в качестве веществ-прототипов лекарственных средств на клеточной модели БХ. Рассмотренные белоклипидные взаимодействия рецептора сигма-1 имеют важное значение для понимания фундаментальных основ функционирования рецептора в клетке. Разработанная методика встраивания рецептора сигма-1 в бислойные мембраны может использоваться для изучения биофизических основ модуляции белков-партнеров рецептора сигма-1.

Полученные в настоящей работе результаты используются в курсах лекций кафедры «Медицинская физика» ИФНиТ СПбПУ: рентгеноструктурный анализ белков, прикладные проблемы нейробиологии.

Апробация работы

диссертационной работы были Результаты представлены на международных российских конференциях: следующих И 18-й международной конференции, посвященной кальций-связывающим белкам и функции кальция в норме и при патологии (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), конференции «Кальций-2014: от фундаментальный основ до клиники» (Calcium 2014: From basics to bedside, 3-5 июля 2014 г, г. Стокгольм, Лаборатории Швеция), совместном семинаре молекулярной нейродегенерации и лаборатории А. Аперии (Aperia-Brismar-Bezprozvanny Lab Meeting, 3 июля 2014 г., Каролинский Институт, г. Стокгольм, Швеция), Международной научной конференции «Наука будущего» (Science of the Future, 17-20 сентября 2014 г, г. Санкт-Петербург, Россия), XVII Зимней молодежной школе ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (29 Рощино, Россия), 12-й международной февраля-5 марта 2015, п. конференции, посвященной болезням Альцгеймера и Паркинсона (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. Гатчина, Россия), Форуме с международным участием «XLIV Неделя Науки СПбПУ» (30 ноября-5 Санкт-Петербург, Россия), Гордоновской научной лекабря 2015 г. конференции «Нейробиология заболеваний мозга» (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).

Представление научного доклада: основные положения

1. Полиглутаминовый тракт белка атаксина-3 находится в двух конформационных состояниях: свободной петли и альфа-спирали. Альфаспиральная конформация стабилизирована двумя протяженными сетями водородных связей: между атомами пептидной группы і и і+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 хантингтина *in vitro* и является нейропротектором в модели болезни Хантингтона.

3. Рекомбинантный рецептор сигма-1 человека кластеризуется на поверхности холестерин-содержащих липосом; в тройных фазоворазделенных липидных смесях ДОФХ:ДПФХ:холестерин рецептор сигма-1 окаймляет рафтовые мембранные микродомены.

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

Содержание работы

Структура и функция белка атаксин-3. Атаксин-3 представляет собой консервативный мультидоменный белок молекулярной массой в 42 кДа и относится к семейству деубиквитиназ. Атаксин-3 содержит следующие домены: N-концевой джозефин-домен JD (каталитический) (1-198 а.к.о.), промежуточный линкер, содержащий полиубиквитин-связывающие мотивы UIM1 и UIM2 (223-263 а.к.о.), а также С-концевой участок, содержащий полиглутаминовую последовательность (вариабельная по длине, 10-84 а.к.о., начиная с 292 а.к.о.) и дополнительный убиквитин-связывающий мотив UIM3. Структуры JD, UIM1-UIM2 были ранее определены методами кристаллографии и ЯМР. Структура полиГ тракта атаксина-3 не определена на настоящий момент, но методом ЯМР было показано, что С-концевой преимущественно, разупорядоченным. фрагмент является, Длина 10-40 полиглутаминовый тракта составляет а.к.о нормальных y индивидуумов и свыше 55 а.к.о у больных СМА 3. ПолиГ тракт атаксина-3 представляет собой почти целиком гомополимерную последовательность, в начале прерванную одним остатком лизина: QQK(Q)_n. Считается, что физиологическая роль атаксина-3 заключается в контроле убиквитинопосредованной протеасомной деградации белков, поскольку за счет своей деубиквитинирующей активности атаксин-3 способен ремоделировать длинные цепи полиубиквитина. Как и в случае других полиглутаминовых заболеваний, мутантный атаксин-3 формирует внутриклеточные (преимущественно, ядерные) включения.

Поскольку токсичность полиГ-содержащих белков связана приобретением ими новой функции вследствие конформационных изменений, происходящих при удлинении полиглутаминового тракта, то возникает необходимость в детальном изучении структуры подобных белков. Единственными кристаллическими структурами полиГ области в нативном белковом контексте являются установленные в нашей лаборатории структуры первого экзона хантингтина с 17 и 36 остатками глутамина, определенные с разрешением 3.0-3.6 Å. С учетом вышесказанного, интересной, хотя и объективно трудоемкой задачей, остается установление кристаллической структуры полиГ с более высоким разрешением.

Структура и функция хантингтина. Болезнь Хантингтона является аутосомно-доминантно наследуемым заболеванием, которое на генетическом уровне обусловлено экспансией триплета САС в кодирующей части гена хантингтина (Htt). Несмотря на многолетние исследования, однозначная функця хантингтина в клетке не установлена. Мутантный хантингтин, как и полиГ-удлиненные белки, образует токсичные другие ядерные И цитоплазматические агрегаты. Интересной особенностью первого экзона хантингтина является взаимоотношение полиГ тракта хантингтина И фланкирующих его последовательностей: N-концевой области (N17) и полипролиновому тракту. В ряде биофизических работ было показано, что непосредственно предшествующая последовательность, полиГ (N17). является про-агрегационной и гомоолигомеризация этого домена является первым этапом агрегации хантингтина. Одним из подходов, направленных на предотвращение агрегации мутантного хантингтина, может являться поиск веществ или соединений, связывающихся с N17. Антитела и интратела, выработанные против N-концевой области, показали свою эффективность на клеточных И мышиных моделях БΧ. Таким образом, подход С N17 терапевтической использованием В качестве мишени является обоснованным.

Структура и функция рецептора сигма-1. Этот трансмембранный эндоплазматического ретикулума белок связывает широкий спектр соединений, известных, как сигма-лиганды, многие из которых в настоящее время широко используются в клинической практике. Фармакологическая активация рецептора с применением селективных сигма-лигандов показала эффективность на свою клеточных И мышиных моделях ряда нейродегенеративных заболеваний, включая болезни Альцгеймера И Хантингтона. Однако, несмотря на многолетние исследования S1R механизм остается его функционирования неизвестным. Считается, что S1R функционирует как белок-шаперон или дополнительная регуляторная субъединица в условиях клеточного стресса, регулируя широкий спектр ионных рецепторов на плазматической мембране каналов И И В эндоплазматическом ретикулуме. Ряд статей указывает на то, что, для нормального функционирования рецептора сигма-1 значимую роль могут белок-липидные взаимодействия. играть Таким образом, актуальным направлением дальнейших исследований является выяснение биофизических основ взаимодействия рецептора с липидами, что до этого времени не было осуществлено в мировой научной практике.

Методы, использованные настоящем В исследовании. Генетические конструкции для экспрессии белков и белки слияния GFP были получены стандартными методами молекулярного клонирования. Белки с точечными мутациями были получены с помощью сайт-направленного мутагенеза. Белки MBP, MBP-Htt-17Q, MBP-Htt48Q, MBP-Htt-82Q, MBP-Htt-138Q, MBP-Atxn3-C были получены в экспрессионной системе E. coli и очищены с помощью аффинной хроматографии на амилозной смоле (NEB, кристаллизационных экспериментов MBP-Atxn3-C США). Для был дополнительно очищен с помощью гель-фильтрационной хроматографии (Superdex 75 10/600, GE, США). Рекомбинатный 6His-S1R был получен в бакуловирусной системе экспрессии (Bac-to-Bac, Invitrogen, США), выделен и очищен с помощью металл-хелатной хроматографии на никель-агарозе (Qiagen, Германия), ионообменной хроматографии (monoQ 5/10, Akta, Швеция) и гель-фильтрации (Superdex 20 10/300, GE Healthcare, США). Для идентификации белков в работе использовался электрофорез в ПААГ с Вестерн-блот анализом с применением специфических последующим соответствующих белков. антител против

MBP-Atxn3-С 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* и определение сингонии и параметров элементарной ячейки кристалла. На этапе интегрирования определяли интегральную интенсивность дифракционных максимумов на дифрактограммах. На этапе шкалирования интенсивности приводили к абсолютной шкале и рассчитывали модули структурных |F_{hkl}|Определение фаз осуществляли методом молекулярного факторов замещения с использованием структуры MBP 1ANF. Для определения поисковой молекулы элементарной ячейке кристалла положения В используют Паттерсона. поиск пространстве Карты Паттерсона В представляют собой карты межатомных векторов молекулы и могут быть рассчитаны по одним лишь амплитудам структурных факторов:

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

Максимумы на картах Паттерсона соответствуют межатомным векторам. Правильное положение молекулы в элементарной ячейке кристалла соответствует максимальному перекрыванию функций для поисковой и искомой структур. На практике, проблему поиска разбивают на вращение и трансляцию молекулы в элементарной ячейке кристалла,

Функция вращения описывается следующим образом:

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

 $P_{obs}(u)$ - 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:

$$Tr(\mathbf{T}) = \int_{(V)} P_{obs}(\mathbf{r}) \cdot P_{calc}(\mathbf{r} - \mathbf{T}) d^3 \mathbf{r} - (4)$$
 функция трансляции

Т - вектор переноса (трансляции).

После определения фаз становится возможным расчет распределения электронной плотности по формуле

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

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

$$\Delta \rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} \left(F_{obs} - F_{calc} \right) \exp i\varphi_{calc} \cdot \exp(-2\pi i(hx + ky + lz))$$
 - (6)

дифференциальная карта электронной плотности.

Для расчета исключенных (OMIT) карт электронной плотности в расчет не включались атомы участка, для которого рассчитывалось распределение [127].

На этапе уточнения структуры такие параметры, как координаты атомов, занятости, тепловые В-факторы варьируются с целью достижения максимального соответствия между экспериментальной и расчетной дифракционными картинами. Количественной мерой этого соответствия является R-фактор

$$R_{factor} = \frac{\sum_{h,k,l} \left| F_{hkl}^{calc} - F_{hkl}^{obs} \right|}{\sum_{h,k,l} F_{hkl}^{calc}}$$

Модели строили независимо для каждого из кристаллов и для каждой молекулы в составе элементарной ячейки кристалла (в случае кристалла С2) в программе Coot. Уточнение проводили в программе Refmac 5, расчет геометрии структуры в программе MOLPROBITY.

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

$$KK\Pi\Pi_{i} = \frac{\sum\limits_{x,y,z} (\rho(x,y,z)_{obs,i} - \overline{\rho(x,y,z)_{obs,i}}) \cdot \sum\limits_{x,y,z} (\rho(x,y,z)_{obs,i} - \overline{\rho(x,y,z)_{obs,i}})}{(\sum\limits_{x,y,z} (\rho(x,y,z)_{obs,i} - \overline{\rho(x,y,z)_{obs,i}})^{2} \cdot \sum\limits_{x,y,z} (\rho(x,y,z)_{obs,i} - \overline{\rho(x,y,z)_{obs,i}})^{2})^{1/2}}$$

где $\rho_{obs,i}(x, y, z)$ - экспериментальное значение электронной плотности для iго остатка в точке x,y,z (рассчитанное по формуле () с использованием экспериментально определенных амплитуд структурных факторов и фаз модели); $\rho_{calc,i}(x,y,z)$ - рассчетное значение электронной плотности для i-го остатка в точке x,y,z с использованием рассчитанных амплитуд структурных факторов и фаз модели. Локальный КППП был рассчитан в программе phenix.map_to_model. Молекулярные поверхности взаимодействия анализировали в программе PISA. ОМІТ карты электронной плотности и расчет коэффициента корреляции в прямом пространстве были использованы для валидации полученной модели. Тепловые В-факторы а.к.о. рассчитывали в программе HBOND, присвоение вторичной структуры по алгоритму DSSP. Модель была визуализирована в программной среде РуМоl.

Для идентификации пептоида HNP1 была синтезирована библиотека соединений, как описано ранее в наших работах. Для синтеза пептоидной библиотеки был применен комбинаторный метод «смешения и разделения», присоединение пептоидного остатка на каждом этапе включало реакцию замещения. Для идентификации ацетилирование и SN2 соединений. связвающихся с амино-концевым участком хантингтина использовался амино-концевой пептид хантингтина bio-N20, имеющий следующую bio-MATLEKLMKAFESLKSFQQQ. последовательность: аминокислотную 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 секвенировали для определения последовательности пептоидов. Одним из идентифицированных соединений был пептоид HNP1. В независимых экспериментах было показано связывания HNP1 с MBP-Htt-48Q и -82Q, но не с МВР. Константа диссоциации была определена методом изотермальной титрационной калориметрии. Для анализа анти-агрегационных свойств **HEK293T** трансфецировали пептоида клетки ЛИНИИ конструкцией, кодирующей Htt-82Q-GFP, в культуральную среду добавляли пептоид HNP1. Спустя 48 часов после трансфеции клетки фиксировали и анализировали с конфокального помощью микроскопа. Для каждой концентрации подсчитывался процент клеток, содержащих ядерные ИЛИ цитоплазматические включения хантингтина относительно GFP-позитивных клеток (количество полей зрения N=20). Для анализа нейропротекторных свойств HNP1 первичные кортико-стриатальные культуры, полученные от мышей дикого типа или линии YAC128. На 7-ой день культивирования к культурам добавляли пептоид HNP1. Нейроны стриатума (на 19-й день культивирования in vitro) визуализировали путем окраски антителами против белка DARPP32. Морфологию синаптических контактов анализировали в программе NeuronStudio.

Для определения внутриклеточной локализации S1R дикого типа и мутантных форм, клетки линии НЕК293Т были ко-трансфецированы флуоресцентно-мечеными белками S1R-GFP (WT, R7ER8E, ΔR7-R8, AAAA, Коэффициент GGGG. W9LW11L) И mCherry-ER. колокализации (Coloc2). ImageJ рассчитывали программе Биохимическое В

фракционирование мембран осуществляли по следующему протоколу: клетки НЕК239Т лизировали в гипотоническом буфере, после чего осаждали митохондриальную фракцию. Цитозоль отделяли от микросомальной фракции с помощью ультрацентрифугирования. Митохондрии отделяли от митохондрий-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 S1R был реконструирован в модельные бислойные мембраны (липосомы). В работе использовались 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфосерин (ДОФХ), следующие липиды: сфингомиелины головного мозга (СМ), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-16:0-06:0 фосфохолин (ДПФX), холестерин, NBD PC $(NBD-\Phi X)$ Рекомбинантный S1R был получен в бакуловирусной системе экспрессии, выделен и очищен до гомогенного состояния с помощью металл-хелатной ионообменной (monoQ) гель-фильрационной (Ni-NTA агароза), И хроматографии (Superdex 200). Ha первом этапе были получены протеолипосомы путем солюбилизации липидных смесей вместе рекомбинантным флуоресцентно-меченым рецептором S1R-AlexaFluor555 и последующим удалением детергента с помощью гидрофобной смолы BioBeads. Очищенные протеолипосомы использовались для получения гигантских однослойных липосом (ГОЛ). Для этого, 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 $D = \frac{4r^2}{\tau_{1/2}}$. Для анализа контактной длины между ЭР и

просвечивающей электронной митохондриями применяли метод микроскопии. Для визуализации ЭР клетки трансфецировали плазмидами HRP-ER (контроль) и S1R-Apex2 (сверхэкспрессия), соответственно. Клетки фиксировали глутаровым альдегидом и уранил-ацетатом, окрашивали тетроксидом осмия последовательно дегидрировали, заключали в смолу и нарезали на тонкие срезы с помощью ультрамикротома. Вторичное окрашивания срезов осуществляли свинцом. Изображения получали с помощью просвечиващего электронного микроскопа JEOL 1200 EX при напряжении на трубке 120 кВ. Для анализа синаптических контактов в модельной гиппокампальной культуре нейронов первичные культуры получали от мышей дикого типа и линии S1RKO. Клетки трансдуцировали

лентивирусными конструкциями для сверхэкспрессии S1R дикого типа или мутанты R7ER8E (DIV 7). На DIV 8 клетки трансфецировали конструкцией TdTomato для визуализации синапсов. Клетки фиксировали на 14 день культивирования, фиксировали и анализировали с помощью конфокальной микроскопии. Синапсы классифицировали в программе NeuronStudio.

Результаты и обсуждение.

Определение и описание кристаллической структуры С-концевого фрагмента атаксина-3. Данный фрагмент (а.к. последовательность S278-D329) 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. Сконцентрированный белок был закристаллизован в двух условиях. Полученные кристаллы (С1 и С2) использовались для получения картины рентгеновской дифракции. Полученные дифрактограммы использовались для получения 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). Кристаллы С1 и С2 имели разные пространственные группы (C1 - P1, C2 – P4₁), параметры элементарной ячейки и упаковку молекул в кристалле. Структура С-концевой области также была различной: полиГ тракт в кристалле С1 находилась в конформации случайной петли в регионе, доступном для растворителя (рис. 1 А). В отличие от кристаллов С1, регион Atxn3-С в кристалле C2 частично экранирован от растворителя симметричносвязанными молекулами MBP (x-1, y, z) и (x-1, y, z-1) в кристалле C2 – в виде 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).



Рис. 1. Структуры Atxn3-С в кристаллах С1 и С2. Короткая N-концевая спиральная последовательность показана зеленым. А. Структура Atxn3-С в кристалле С1. Б. Структура Atxn3-С в кристалле С2. Мальтозо-связывающий белок MBP показан в виде поверхности серого цвета. N-концевая фланкирующая последовательность – зеленым, полиГ тракт – оранжевым, С-концевая фланкирующая последовательность – синим. Две молекулы MBP показаны в виде поверхностей серого цвета.

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 рядом расположенными остатками MBP (Q387(NE2)-E22(OE2), Q389(NE2)-D95(OD2), Q394(NE2)-D236(OD2)) и аминогруппой лизина (Q390 (OE2)-K295(NZ), Q392(O)-Y176(OH), с карбоксильными группами полипептидного (Q390(NE2)-D296(O)/K295 Q393(NE2)-T237(O), (O);остова с 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 между остатками глутамина. Альфа-спиральная конформация Atxn3-C стабилизирована дополнительно внутримолекулярными водородными связями, формируемыми между остатками глутамина (рис. 2, вкладки А, Б, В, а также табл. 1). Восемь из 13 остатков вовлечены в формирование прямых внутриспиральных водородных связей между і и і+4 остатком (в четырех случаях) и і и і+3 остатком (в одном случае). Помимо этих прямых взаимодействий между остатками глутамина, остаткок Q385 взаимодействует с неглутаминовым остатком i-4 (Y381) и i+3 K388 через водородные связи с координированной молекулой воды. Лишь один остаток Q392 не вовлечен во внутриспиральные взаимодействия, взаимодействуя Y175 MBP. С Направление большинства водородных связей ориентированы параллельно оси альфа-спирали.



Рис. 2. Структура полиГ спирали в кристалле С2. Участок полиГ в составе MBP-Atxn3-С показан оранжевым цветом в ленточном представлении. Боковые цепи а.к.о. показаны как палочки. N-концевая фланкирующая последовательность показана зеленым, а остатки МВР – серым цветом. Координированные молекулы воды показаны голубым цветом. Межмолекулярные водородные связи показаны черными пунктирными линиями. Внутримолекулярные водородные связи показаны красными пунктирными линиями. Карты электронной плотности 2F₀-F_c для Atxn3-C показаны в виде синей изоповерхности (порог отсечки 1 σ). На верхней панели структура повернута на 180° относительно нижней панели. На красных вкладках детально показаны внутриспиральные взаимодействия между остатками глутамина А (с соответствующей ОМІТ картой электронной плотности с порогом отсечки 0.9 с): (A) Y381-Q385-K388; (Б) Q387-Q391 и Q390-Q394; (В) Q386вкладках детально показаны Q389–Q393–Q397. Ha синих межмолекулярные взаимодействия между остатками глутамина (в виде оранжевых палочек) и остатками МВР (в виде серых палочек) с соответствующей ОМІТ картой электронной плотности с порогом отсечки 0.9 о: (Г) Q392-Y176, Q393-T237, Q387-E22; (Д) Q390-K295/K295/D296; (Е) Q394–D236; и (Ж) Q389–D95.

Аминокислотный	Аминокислотный	Расстояние, Å
статок 1	остаток 2	
Y381 (OH)	Q385 (OE1)	Y381HOH; 2.6
		HOHQ385; 2.8
Q385 (NE2)	K388 (NZ)	Q385HOH; 2.9
		HOHK388; 2.8
Q387 (NE2)	Q391 (OE1)	3.5
Q386 (NE2)	Q389 (OE1)	2.9
Q389 (NE2)	Q393 (OE1)	2.7
Q393 (NE2)	Q397 (OE1)	4.0
Q390 (NE2)	Q394 (OE1)	3.0

Табл. 1. Внутриспиральные водородные связи между остатками глутамина в регионе полиГ кристалла С2.

Две кристаллические структуры показали, что полиГ тракт находится в двух конформациях: свободной петли и альфа-спирали, что согласуется с полученными кристаллическими структурами ранее первого экзона хантингтина, где было показано, что полиГ тракт способен принимать целый спектр различных переходных между спиралью и петлей структур. Конформационная гетерогенность, наблюдавшаяся для кристалла Htt, проявила себя как два типа кристаллов Atxn3-C. Наша гипотеза состоит в том, что полиглутаминовый тракт хантингтина и атаксина-3 находится в конформационном равновесии между альфа-спиральной структурой и структурой случайной петли. Эта гипотеза подтверждается рядом других структурных исследований полиглутамин-содержащих последовательностей, где наблюдалось подобное равновесие [18, 19, 66, 78-83].

Подобная внутримолекулярная стабилизация структуры полиГ была описана в ряде теоретических работ, но впервые наблюдалась нами экспериментально. В модели, предложенной Lathrop и коллегами, боковые остатки глутамина вовлечены в формирование межостаточных водородных связей между остатками і и і+4 [92]. Кристаллическая структура полиГ в кристалле С2 показывает, что остатки глутамина способны формировать водородные связи как с i+4, так и с i+3 остатками. При анализе меж- и внутримолекулярных взаимодействий полиГ делается вывод, что 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.

Интересна связь структуры полиглутаминового тракта в контексте нейродегенеративных заболеваний. В структуре MBP-Atxn3 остатки глутамина формируют множественные координированные водородные связи вдоль полиглутаминовой спирали и ограниченное число взаимодействий с

МВР. Первым, кто предложил модель олигомерной бета-складчатой структуры полиГ, известную, как полярная застежка, был М. Перутц [104]. Согласно модели полярной застежки, Q-Q взаимодействия стабилизируют бета-складчатую конформацию полиглутаминовых агрегатов. Структура модель полярной застежки Atxn3-C И демонстрируют, как 0-0 взаимодействия могут стабилизировать вторичные структуры белка. Тем не менее, эффект стабилизации альфа-спиральной структуры полиглутамина, будет менее выраженным по-видимому, гораздо В присутствие 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 аккумуляции полиглутаминовых фрагментов, эффект Q-Q стабилизации формированию полиглутаминовых может приводить к агрегатов. Исключение растворителя может приводить к ассоциации глутамина, посредством как внутри- так и межмолекулярных взаимодействий, осложняя протеасомную деградацию агрегатов подобных олигомеров и ускоряя макроагрегацию полиглутамин-содержащих белков.

Синтез пептоидной библиотеки и идентификация нового пептоидного соединения HNP1, которое специфически связывается с амино-концевой областью хантингтина. На первом этапе была синтезирована библиотека, насчитывающая порядка 60000 уникальных соединений (рис. 3 А). При синтезе использовались следующие первичные амины: 1,4-диаминобутан, триптамин, пиперониламин, изобутиламин, (R)-метилбензиламин, аллиламин, фурфуриламин, метоксиэтиленамин, этаноламин. Остаток пролина был фиксирован в четвертом положении.

С использованием пептида bio-N20 В качестве было мишени 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 хантингтина из многомерной пептоидной библиотеки. А. Общая химическая структура пептоидной библиотеки. Б. Химическая структура HNP1. В. Связывания пептоида HNP1 с рекомбинантным хантингтином MBP-Htt-17Q и -45Q.

Для анализа антиагрегационных свойств пептоида HNP1 *in vitro* в клетках линии HEK293T был экспрессирован флуоресцентно-меченый хантингтин Htt-82Q-GFP. Пептоид HNP1 добавлялся в культуральную среду после трансфекции клеток, после чего спустя 48 часов клетки фиксировали и анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии. Было показано, что добавление HNP1 подавляет агрегацию мутантного хантингтина в клетках, экспрессирующих флуоресцетно-меченый белок Htt-82Q-GFP (рис. 4 A).



Рис. 4. Агрегация флуоресцентно-меченого хантингтина *in vitro* и антиагрегационные свойства пептоида HNP1. А. Пример агрегации полиГ-удлиненного хантингтина в клетках линии HEK293T. Клетки были трансфецированы вектором, кодирующим белок слияния первого экзона хантингтина (17Q или 138Q) с флуоресцентным белком GFP. Внутриклеточные агрегаты показаны стрелками. Б. Антиагрегационные свойства пептоида HNP1. Клетки, экспрессирующие белок слияния Htt82Q-GFP культивировались

в присутствие соответствующих концентраций HNP1, после чего был вычислен процент клеток, содержащих ядерные или цитоплазматические агрегаты хантингтина.

Для анализа нейропротекторных свойств идентифицированного пептоида. Наконец, на модельной первичной культуре нейронов, полученной от мышей, экспрессирующих мутантный хантингтин, было показано, что добавление соединения оказывает нейропротекторный эффект и стабилизирует синаптические контакты нейронов стриатума (рис. 5).



Рис. 5. Нейропротекторные свойства пептоида HNP1 в смешанных кортикостриатальных культурах нейронов. А. Изображения дендритов клеток стриатума, окрашенных антителами против DARPP32. Б. Количественный анализ линейной плотности дендритных шипиков в культурах дикого типа и YAC128 в присутствии и отсутствии соединения HNP1 (N=2).

Идея использования N17 в качестве мишени не является новой, так как против данного участка были ранее выработаны анти- и интратела, показавшие свою эффективность на клеточных и мышиных моделях болезни Хантингтона. Пептоиды, тем не менее, обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционными пептидными соединениями. (1) обладают более высоким разнообразием по сравнению с пептидами, (2) вследствие модифицированной пептидной связи, не способны расщепляться протеазами, что выражается в более высокой стабильности пептоидов in vivo, (3) короткие пептоиды (c 8) являются числом звеньев меньше мембранопроницаемыми. Таким образом, полученные в настоящей работе соединения-прототипы могут служить основой для дальнейшей разработки пептоидных препаратов в сфере нейродегенерации в целом и терапии болезни Хантингтона в частности.

Белок-липидные взаимодействий рецептора сигма-1 человека. Для биофизических и биохимических исследований были получены генетические

конструкции для экспрессии в клетках Sf9 (6His-S1R) и флуоресцентномеченые белки слияния с GFP (S1R-GFP). В культуре клеток НЕК293Т было показано, что S1R-GFP локализуется в особых областях ЭР (рис. 6 А). С помощью биохимического фракционирования мембран было показано, что рецептор дикого типа находится, преимущественно, в составе мембран, ассоциированных с митохондриями (МАМ) (рис. 6 В и Г). С помощью биоинформатического анализа первичных аминокислотных последовательностей рецептора, в составе трансмембранного участка был идентифицирован предполагаемый сайт связывания холестерина (кластер CRAC-последовательностей). Мутации по данным аминокислотным остаткам (R7ER8E, ΔR7-R8, W9LW11L) приводили к перераспределению рецептора из МАМ в тубулярный ЭР (рис. 6 Б). С помощью биохимического фракционирования мембран было показано, что мутант R7ER8E равномерно распределен как в МАМ, так и в тубулярном ЭР. Наконец, в экспериментах pull down было продемонстрировано, что как рекомбинантный, так и эндогенный рецептор специфично связывается с холестерин-агарозой (рис. 6 Д).



Рис. 6. Рецептор сигма-1 локализуется в особых областях ЭР (МАМ), что определяется его способностью связываться с холестерином. А. Иммунофлуоресцентный анализ внутриклеточной локализации S1R (S1R-GFP и маркер ЭР mCherry-ER). Б. Коэффициенты колокализации Мандерся для рецептора дикого типа и мутантов по сайту связывания с холестерином. В. Биохимическое фракционирование мембран: рецептор дикого типа находится преимущественно в МАМ, в то время как мутант R7ER8E (RR) равномерно распределен в ЭР. Г. Количественный анализ Вестерн-блота на рис. В. Д. Связывания эндогенного и рекомбинантного S1R с холестерин-агарозой.

Таким образом, было показано, что белок-липидные взаимодействия, а связывание холестерином, именно, с определяют внутриклеточную S1R. локализацию И, вероятно, могут играть важную роль В функционировании рецептора сигма-1. Молекулярные механизмы белоклипидных взаимодействий были далее исследованы в серии биофизических экспериментов на модельных бислойных мембранах.

Известно, что определенные контактные области ЭР, включая ассоциированные с митохондриями мембраны, характеризуются особым липидным составом и богаты так называемыми липидными рафтовыми микродоменами. Для прямых биофизических исследований *in vitro* была разработана методика реконструкции рекомбинантного рецептор сигма-1 человека в модельные бислойные мембраны (липосомы). Рекомбинатный рецептор был, экспрессирован в бакуловирусной системе экспрессии, выделен и очищен до гомогенного состояния с помощью металл-хелатной, ионообменной и гель-фильтрационой хроматографии (рис. 7). Белок был ковалентно мечен с помощью флуорофора Alexa Fluor 555.



Рис. 7. Выделение и очистка рекомбинантного рецептора сигма-1 человека. А. Выделение мембран и очистка с помощью металл-хелатной хроматографии. Соответствующие фракции обозначены, окраска Кумасси. Б. Очистка с помощью анионообменной хроматографии и гель-фильтрации. Окраска Кумасси. В. Профиль гельфильтрации выделенного белка при разделении на колонке Superdex 200 10/300. Фиолетовый – рецептор S1R, красный – стандарт BSA.

Рекомбинантный рецептор использовался для встраивания в липосомы и получения гигантских одномембранных липосом (ГОЛ). Как видно из полученных результатов (рис. 8, верхняя панель), сигма-1 рецептор равномерно распределен на поверхности ГОЛ, полученных из липида ДОФХ (DOPC). Для получения липосом другого липидного состава использовались смеси ДОФХ с холестерином. В данном случае наблюдалась кластеризация рецептора в определенных областях на поверхности липидного бислоя и

соответствующее уменьшение интенсивности плотности диффузнораспределенного рецептора.

Опираясь на полученные ранее биохимические данные по связыванию рецептора с холестерином, было предположено, что кластеризация рецептора приводит также к соответствующему перераспределению холестерина в составе модельных гигантских липосом и формированию холестеринкоэффициентов микродоменов. определения богатых липидных Для диффузии использовался метод FRAP (fluorescent recovery after photobleaching). При увеличении концентрации холестерина наблюдалось уменьшение коэффициента диффузии, что соответствует увеличению вязкости мембраны в присутствии холестерина (D=1.3 мкм²/c) (рис. 8 Б). рецептора сигма-1 Встраивание также приводило К понижению коэффициента диффузии мембранных липидов, поскольку белок представляет собой препятствие для свободной диффузии метки. Интересно, что в соответствии с нашим предположением о сигма-1-опосредованном мембранных перераспределении 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, секвестируя холестерин, что приводит к соответствующему уменьшению эффективной концентрации холестерина в свободном от сигма-1 рецептора бислое и увеличению эффективной концентрации холестерина в сигма-1-богатых липидных кластерах.



Рис. 8. Реконструкция рецептора сигма-1 в гигантские одномембранные липосомы различного липидного состава. А. Верхняя панель: реконструкция рецептора в липосомы, полученные из липида DOPC. Результаты лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (S1R-Alexa555, NBD-PC). Нижняя панель: реконструкция рецептора в липосомы, содержащие 20% холестерин (S1R-Alexa555, NBD-PC). Б. Результаты FRAP-измерений коэффициента диффузии метки NBD-PC в липосомах различного состава в присутствии и отсутствии рецептора сигма-1.

На клеточной линии НЕК293Т было показано, что сверхэкспрессия рецептора приводит к увеличению контактной длины ЭР-митохондрии (данные просвечивающей электронной микроскопии, рис. 9 А). В модельных нейрональных культурах было продемонстрировано, что мутантная форма белка R7ER8E не может компенсировать утраченную функцию рецептора дикого типа по поддержанию синаптических контактов in vitro (рис. 9 Б). Полученные нами данные позволяют выдвинуть обоснованную гипотезу о том, что *S1R является организатором и стабилизатором рафтовых микродоменов* в клетке.



Рис. 9. Функциональное значение рецептора сигма-1. А. Сверхэкспрессия S1R приводит к увеличению контактной длины между ЭР и митохондриями. Б. Функционально-активный рецептор дикого типа необходим для поддержания синаптических контактов в модельной гиппокампальной культуре нейронов. Мутант R7ER8E не способен восполнить утраченную функцию рецептора в культурах, полученных от мышей, нокаутных по гену SIGMAR1.

Последовательность событий в присутствии рецептора сигма-1 в мембране содержащей рафтовые, нерафтовые липиды и холестерин может быть графически проиллюстрирована на рис. 8. В случае, если холестерола в мембране недостаточно для возникновения фазового разделения, фосфолипиды, сфингомиелины холестерин распределены в бислое И примерно гомогенно (рис. 10 A). Холестерин предпочтительно взаимодействует со сфингомиелинами. В присутствии рецептора сигма-1 наблюдается кластеризация рецептора и холестерина, что приводит к увеличению локальной (эффективной) концентрации холестерина (переход из точки Ld в точку Lo на фазовой диаграмме) (рис. 10 Б). Это способствует разделению фаз на Lo (рафтовую) и Ld (нерафтовую) (рис. 10 В). Рецептор сигма-1 окаймляет и стабилизирует образованные липидные микродомены.



Рис. 10. Рецептор сигма-1 в роли организатора и стабилизатора липидных рафтов ЭР (пояснения в тексте).

Существующие литературные данные показывают, что отсутствие S1R приводит к глобальным перестройкам в мембранном составе на клеточном уровне. Рафт-организующая функция рецептора, таким образом, может оказывать прямое и опосредованное влияние на локализацию, функцию и позиционирование рафтовых и нерафтовых белков, что, в целом, позволяет объяснить «многозадачность» S1R в клетке. В заключении главы, формулируется гипотеза о S1R-опосредованном механизме регулирования ионных каналов через белок-липид-белковые взаимодействия. Рецептор функционирует, по-видимому, счет перераспределения сигма-1 за холестерина (и, возможно, других типов липидов) между свободной от холестерина жидкой липидной фазой и рафтовой фазой ЭР и стабилизирует последнюю, дифференциально и разнонаправлено регулируя многие мембранные каналы и рецепторы.

В Заключение. настоящей работе 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 предоставила новые данные о внутритакже И межмолекулярных взаимодействиях полиГ тракта. Из пептоидной библиотеки было определено новое соединение HNP1, связывающиеся с амино-концевой областью и обладающее антиагрегационными и нейропротекторными свойствами in vitro. Была сформулирована гипотеза о белок-липид-белковом механизме функционирования рецептора сигма-1 через стабилизацию липидных микродоменов впервые были представлены экспериментальные И биофизические данные в пользу того, что рецептор сигма-1 является рафтовым организатором эндоплазматического основным липидов ретикулума.

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 C1) и альфа-спирали (кристалл C2).

2. Структурной особенностью полиглутаминового тракта в альфа-спиральной конформации является то, что она стабилизирована двумя сетями водородных связей: между атомами пептидной группы і и і+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 (Kd=20 мкM).

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. В тройных фазово-разделенных смесях ДОФХ:ДПФХ:холестерин рецептор окаймляет липидную Lo фазу.

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 ретикулума, 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*.

Список публикаций по теме исследования

Статьи

1. **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. – T. 3, No 6. – C. 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 // Научнотехнические ведомости Санкт- петербургского государственногополитехнического университета. Физико-математические науки. – 2016. – Т. 1 (237). – С. 48-65. DOI: 10.5862/JPM.237.5

Материалы конференций

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

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

6. **Zhemkov VA**, Kulminskaya AA, Bezprozvanny IB, Kim M. Crystal structure of the ataxin-3 carboxy terminal region. 2015. Neurodegenerative diseases, V. 15, Suppl. 1, ADPD5-0230, 1659.

7. 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.

8. Жемков В.А., Кульминская А.А., Безпрозванный И.Б., Ким М.В.. Структурные особенности полиглутаминового тракта атаксина-3. 5 Съезд Биофизиков России. Материалы докладов. – 2015 - Т.1. – С. 84

9. 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.

10. В.А. Жемков, С.А. Корбан, А.А. Кульминская, И.Б. Безпрозванный, М.В. Ким. Гетерологическая экспрессия, выделение и очистка сигма-1

рецептора человека. Конференция молодых ученых и специалистов ПИЯФ. Сборник докладов. – 2015. - С. 54

11. **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 (17-20 September 2014, Saint-Petersburg, Russia). 2014, abstract online

http://www.p220conf.ru/abstracts/download/2-life/334- v-zhemkov

12. **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 biotinylatedhuntingtin N17 domain. Calcium 2014: From basics to bedside (03 July-05 July 2014, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden). 2014. P. 5

13. 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 СПбГПУ» (2-7 декабря 2013, Санкт-Петербург, Россия). 2013, сборник Института физики, нанотехнологий и телекоммуникаций, ч.2., С. 185-7.

14. Жемков В.А., Дрожжина Т.А., Ким М.В., Вали Ш., Безпрозванный И.Б. СтруктураN-терминального конца хантингтина в комплексе с пептоидом HNP1. Всероссийская конференция «Системно-технические решения проблем визуализации в нейродегенерации» (23-25 октября 2013, Санкт-Петербург, Россия). 2013. Сборник тезисов, 2013, С. 4-8.

15. 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 (30 июня – 4 июля 2013, Кируна, Швеция). 2013, сборник тезисов, С. 20.

Аспирант Жемков Владимир Андреевич