

## 基于 Asn27 脱酰胺化修饰探究抑制 A $\beta$ 42 聚合的潜在作用位点

卓越, 周敏, 张涛\*

(天津医科大学生物医学工程与技术学院, 天津 300070)

**摘要:** 阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 主要的病理特征表现为  $\beta$ -淀粉样蛋白 (amyloid- $\beta$  protein, A $\beta$ ) 在细胞外聚合形成斑块。抑制 A $\beta$  分子聚合, 阻止 A $\beta$  分子聚合形成具有神经毒性的寡聚体是开发治疗 AD 药物的方向之一。研究表明当 A $\beta$ 42 中 Asn27 发生脱酰胺化修饰后, 能够有效阻止 A $\beta$  单体发生聚合, 但具体作用机制尚不清楚。针对此问题, 本研究采用分子动力学模拟方法, 探究 Asn27 发生脱酰胺化修饰对 A $\beta$ 42 单体结构的改变和对聚合的影响。结果表明, A $\beta$ 42 的 Asn27 发生脱酰胺化修饰会破坏 D23~K28 之间形成的盐桥, 抑制 Turn 区域残基形成  $\beta$  转角结构, 导致羧基末端 (C-terminal region, CTR) 与氨基末端 (N-terminal region, NTR) 区域不能形成反向平行的  $\beta$  折叠, 使得 A $\beta$ 42 链内相互作用减弱。Asn27 发生脱酰胺化修饰引起结构的改变, 导致 A $\beta$ 42 单体间的聚合作用下降, 这也与之前的实验结果相符合。D23~K28 盐桥的形成对于促进 A $\beta$ 42 单体的聚合具有重要作用, 将是针对抑制 A $\beta$ 42 聚合的潜在药物设计位点。

**关键词:** 阿尔茨海默症; 淀粉样蛋白; 脱酰胺化修饰; 分子动力学模拟; 盐桥; 药物设计

中图分类号: R914.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)05-0950-08

## Exploring potential affected site for the inhibition of A $\beta$ 42 polymerization based on Asn27 deamidation modification

ZHUO Yue, ZHOU Min, ZHANG Tao\*

(School of Biomedical Engineering and Technology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract:** One of pathological features of Alzheimer's disease (AD) is extracellular aggregation of amyloid- $\beta$  protein (A $\beta$ ) forming senile plaques. Investigation on inhibition of A $\beta$  aggregation can be crucial for designing effective drugs against AD. Previous studies have demonstrated that the deamidation at Asn27, a type of post translation modification, significantly prevented the polymerization of A $\beta$  monomers. But the underlying mechanism is still unclear. Therefore, we investigated the possible effect of Asn27 deamidation on structure and aggregation of A $\beta$ 42 monomer using molecular dynamics simulation. The results showed that the deamidation of Asn27 can directly disrupt the salt bridge formed between D23 and K28, and effectively decrease the content of  $\beta$ -sheet that is important for aggregation of A $\beta$ . Moreover, the inability at C-terminal region (CTR) and N-terminal region (NTR) to form antiparallel  $\beta$ -sheets further weakens the intra-peptide interaction of A $\beta$ 42 monomer. These changes caused by Asn27 deamidation lead to the decline of the aggregated trend of A $\beta$ 42 monomer, which is consistent with the experimental observation. According to these results, the salt bridge formed between D23 and K28 plays an important role in promoting the polymerization process between A $\beta$ 42 monomers, and disrupting this interaction may be a potential direction for further designing drugs to inhibit aggregation of A $\beta$ 42. In summary, this study shows a potential affected site that can efficiently inhibit aggregation of A $\beta$ 42.

收稿日期: 2019-11-22; 修回日期: 2019-12-14.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31300597).

\*通讯作者 Tel: 86-22-83336939, E-mail: zhangtao@tmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0928

**Key words:** Alzheimer's disease; amyloid peptide; deamidation modification; molecular dynamics simulation; salt bridge; drug design

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以学习能力衰退为主要临床表现的中枢神经系统退行性疾病<sup>[1,2]</sup>。随着全球老龄化的日趋严重, 据估计到本世纪中叶, 每 33 秒就会出现一例新发 AD 患者, 全球 AD 患者数预计高达 1.3 亿, 其造成的死亡率也逐步升高<sup>[3]</sup>。然而, 目前仍然不存在有效预防或治疗 AD 发病的措施, 因此对有效药物干预的需求越来越明显。

抗 AD 的药物设计主要基于 AD 发病机制, 研究显示, AD 主要的病理特征表现为  $\beta$ -淀粉样蛋白 (amyloid- $\beta$  peptide, A $\beta$ ) 在细胞外聚合形成斑块和 Tau 蛋白异常磷酸化引起的细胞内神经原纤维缠结<sup>[4-7]</sup>。目前仅有 4 种 FDA 批准的药物用于 AD 治疗, 其中 3 种是胆碱酯酶抑制剂, 另外 1 种是非竞争性 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸 (*N*-methyl-*D*-aspartate, NMDA) 受体拮抗剂<sup>[8-10]</sup>。但以上药物仅能缓解临床症状, 不能有效阻止疾病的发病进程。究其原因, 最核心的问题是对 AD 的致病机制研究深度不够和缺失药物设计有效的靶点, 因此深入研究 AD 致病机制, 寻求有效的潜在靶点对于治疗 AD 的药物设计和研发具有重要意义。

蛋白质的翻译后修饰 (post-translational modification, PTM) 作为一种有效调节蛋白质功能的方式, 参与了多种生理及病理生物学过程, 其中对 AD 相关生物标志物的发现具有重要作用<sup>[11]</sup>。大多数与 AD 相关的蛋白质都需要 PTM, 包括 Tau 蛋白、淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP)、A $\beta$  等。目前研究发现, A $\beta$ 42 存在着不同类型的 PTM, 包括磷酸化、糖基化、脱酰胺化、甲基化和焦谷氨酸化等<sup>[12-16]</sup>。这些修饰可以改变 A $\beta$ 42 的侧链结构, 而进一步影响其构象变化和聚合过程。Kumar 等<sup>[17-19]</sup>通过动物模型验证了 A $\beta$ 42 的 S8 磷酸化修饰可加速 A $\beta$ 42 聚合物的形成, 并增加聚合物毒性; Jawhar 等<sup>[14,20-22]</sup>通过电子显微镜和动物模型研究发现, 氨基端截短型的 A $\beta$ 42 中 E3 和 E11 发生的焦谷氨酸化修饰会阻碍脑内 A $\beta$  清除机制, 加速聚合物的形成, 并且导致聚合物毒性增强。而与前两种修饰不同, Osaki 等<sup>[15]</sup>应用荧光、圆二色光谱、红外吸收光谱技术发现 A $\beta$ 42 的 N27 发生脱酰胺化修饰会有效减慢聚合物形成的速率, 但具体机制尚不清楚。因此, 阐述脱酰胺化修饰抑制 A $\beta$ 42 聚合的机制有重要的研究价值, 不仅能为药物靶点的确定提供依据, 而且能为搜寻有效的小分子提供研究方向。

A $\beta$ 42 单体是形成聚合物结构的基础, A $\beta$ 42 二聚

体是形成寡聚物的最小单位。研究表明, 富含无规卷曲或  $\alpha$  螺旋结构的单体不易发生聚合, 而富含  $\beta$  折叠结构的单体易发生聚合, 两种结构的转变是聚合发生与否最重要的环节<sup>[23-25]</sup>。为此, 本文将通过分子动力学 (molecular dynamics, MD) 模拟方法, 从结构水平探索第 27 位天冬酰胺发生脱酰胺化修饰对于 A $\beta$ 42 单体结构改变的影响, 并研究 N27 脱酰胺化修饰抑制 A $\beta$ 42 聚合的分子机制, 以发现潜在的药物靶点, 为今后基于 A $\beta$ 42 为靶点的药物设计提供重要参考信息。

## 材料与方法

**构建体系** A $\beta$ 42 单体结构 (PDB ID: 5oqv<sup>[26]</sup>) 从蛋白质结构数据库 (protein data bank, PDB) 获得。该结构中的 A 链为未被修饰的 A $\beta$ 42 单体 (A $\beta$ 42N<sup>27</sup>)。应用 Vienna-PTM 网站 (<http://vienna-ptm.univie.ac.at>, 用于构建翻译后修饰的蛋白质结构平台, 并提供相对应分子力场<sup>[27,28]</sup>), 将 A $\beta$ 42 单体中 N27 进行脱酰胺化修饰, 得到 N27 发生脱酰胺化修饰为 D27 的 A $\beta$ 42 单体结构 (A $\beta$ 42D<sup>27</sup>), 并从该网站下载相应的分子力场。

**分子动力学模拟** 本研究中所有模拟均采用 Gromacs 软件进行 (版本号: 5.0.1), 对于未修饰的 A $\beta$ 42 单体的模拟应用 GROMOS96 54A7 力场, 对于已修饰的 A $\beta$ 42 单体的模拟应用翻译后修饰 GROMOS96 54A8 力场<sup>[29]</sup>。模拟的详细设置如下: 在初始结构中添加立方体盒子, A $\beta$ 42 单体距离盒子边缘的最小距离为 1.0 nm; 向盒子中添加 TIP3P 水模型和 Na<sup>+</sup> 离子或者 Cl<sup>-</sup> 离子, 使系统保持电中性; 然后对体系使用最大值为 10 kJ·mol<sup>-1</sup> 的下降法进行能量最小化, 得到的构象用于平衡模拟; 模拟温度设定为 300 K, 使用 LINCS 算法进行位置约束, 首先进行 500 ps 的 NVT 平衡模拟, 使体系达到稳定的温度; 然后设置在一个标准大气压下进行 1 000 ps 的 NPT 平衡模拟, 最后进行 100 ns 的 MD 模拟。模拟过程中采用原子无位置约束, 所有时间步长均设定为 2 fs。使用 Particle-mesh Ewald (PME) 方法计算长程静电相互作用, 格点宽度设为 0.16 nm; 使用 Lenard-Jones 函数计算范德华力和短程静电相互作用, 截断距离设定为 1.0 nm。为减少计算量, 使用 LINCS 算法对体系内所有成键原子之间的相对距离进行固定。

采用 GROMACS 内置模块程序和 Python 脚本对 MD 轨迹进行分析。使用 GROMACS 软件中的 gmx\_rmsd 命令计算均方根偏差 (root mean square deviation,

RMSD); 使用 `gmx_rmsf` 命令计算均方根波动 (root mean square fluctuations, RMSF); 使用 GROMACS 软件中的 `gmx do_dssp` 命令计算模拟过程中的二级结构变化; 使用 GROMACS 软件中的 `gmx_mdmat` 命令计算残基接触图, 截断距离设定为 0.5 nm; 使用 GROMACS 软件中的 `gmx_cluster` 进行聚类计算, 阈值设定为 0.5 nm。

**结合能计算** 采用 MM-PBSA 方法计算 A $\beta$ 42 结构中关键区域之间的结合能。结合能的计算表达式为:  $\Delta G_{\text{binding}} = E_{\text{MM}} + G_{\text{solvation}} - (G_{\text{CTR}} + G_{\text{NTR}})$ , 其中  $G_{\text{CTR}}$  和  $G_{\text{NTR}}$  分别为指定区域 CTR 和 NTR 中残基在溶剂中的总结合能,  $E_{\text{MM}}$  是真空中分子构象能,  $G_{\text{solvation}}$  是溶剂化的自由能。分子构象能包括键合能和非键合能, 其中非键合能主要包括静电相互作用和范德华作用。溶剂化的自由能包括极性能和非极性能, 其中通过溶剂可及表面积计算极性能, 通过用溶剂表面张力系数 ( $\gamma$ ) 与溶剂可及表面积的积计算非极性能,  $\gamma$  在 A $\beta$ 42 和水中的值分别设为 1 和 80。

## 结果

### 1 结构稳定性分析

为了研究 27 位天冬酰胺发生脱酰胺化修饰对 A $\beta$ 42 单体结构的稳定性影响, 本研究计算了两个模拟体系在整个模拟时间内 A $\beta$ 42 单体骨架原子的 RMSD 值, 结果如图 1a 所示。从图中可以看出, 两个模拟体系 RMSD 值在模拟过程的前 10 ns 内急剧上升, 20 ns 之后呈现缓慢波动, 50~100 ns 时波动趋于稳定, 表明两个体系的结构变化趋于收敛, 因此本研究中所有的分析均在 50~100 ns 的模拟轨迹中进行。另外, 尽管两个体系的骨架原子在模拟前具有相同结构, 但在模拟过程中发生修饰的 A $\beta$ 42 单体结构的 RMSD 值始终大于未发生修饰的 A $\beta$ 42 单体结构, 说明 N27 发生脱酰胺化修饰对于 A $\beta$ 42 结构的稳定性产生了一定影响。

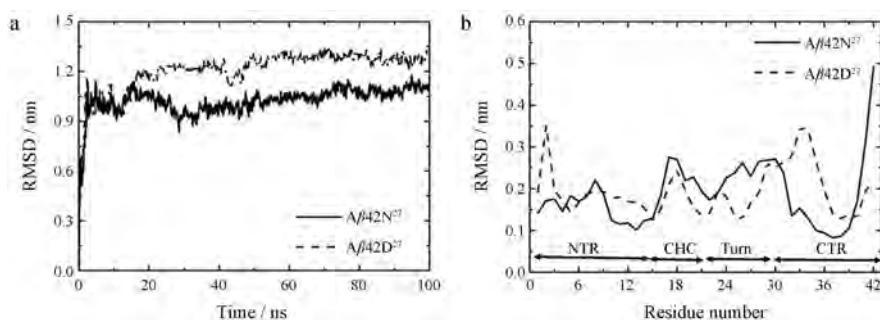
为了进一步分析两个 A $\beta$ 42 单体结构中各个残基

在模拟过程中的变化, 分别计算了 50~100 ns 模拟时间内 A $\beta$ 42 单体中每个残基骨架原子的 RMSF 值。RMSF 表示残基构象的变化程度, 值越大说明残基在模拟过程中的构象变化幅度越大。两个体系的残基骨架原子的 RMSF 结果如图 1b 所示, 从图中可以看出, 二者残基整体波动趋势大致相同, 但在个别区域内 RMSF 呈现了不同的改变。比如在 A $\beta$ 42 单体的 Turn 区域 (E22~G29), N27 发生脱酰胺化修饰可以明显降低该区域残基的 RMSF 波动, 这可能与脱酰胺化修饰后可以抑制 Turn 区自身结构的转变, 进而影响该区域的残基波动有关; 由于中央疏水 (central hydrophobic cluster, CHC) 区域与 Turn 区域相邻, 与 Turn 区域类似, 脱酰胺化修饰也降低了 CHC 区域 (K16~A21) 的 RMSF 值。与以上两个区域不同, NTR 区域中残基 (D1~F4 和 S8~Q15) 的 RMSF 值明显高于未修饰的 A $\beta$ 42 单体中相应的残基, 而残基 R5~D7 波动又低于未发生修饰的 A $\beta$ 42 单体中相应的残基, 这可能与 NTR 区域中的残基结构灵活、无序有关。另外 CTR 区域 (I31~V39) 残基的 RMSF 值也明显高于未修饰的 A $\beta$ 42 单体中相应的残基, 表明该区域内的残基波动性增强, 可能会导致该区域内二级结构发生改变。

综上所述, A $\beta$ 42 第 27 位天冬酰胺进行脱酰胺化修饰会引起不同位置残基 RMSF 值的波动性发生改变, 其中, CHC 区和 Turn 区的残基 RMSF 值波动性降低, CTR 区 (I31~V39) 和 NTR 区 (S8~Q15) 残基 RMSF 值波动性增强, 结构变得更为柔性。

### 2 盐桥分析

基于 A $\beta$ 42 原纤维结构分析发现, Turn 区域中的 D23 和 K28 易形成盐桥, 而形成的盐桥能够进一步稳定两个  $\beta$  折叠的回旋结构<sup>[30]</sup>。因此 D23 和 K28 形成盐桥的概率可以用来评估 A $\beta$ 42 单体形成聚合物的趋势。研究表明, 两个带电残基形成盐桥的条件是参与形成盐桥的原子间距离小于 0.46 nm<sup>[31]</sup>。因此本研究计算了在平衡时间内两个体系中 D23 骨架 C 原子与 K28 骨



**Figure 1** Comparison of structural flexibility between A $\beta$ 42N<sup>27</sup> and A $\beta$ 42D<sup>27</sup>. a: The root mean square deviation (RMSD) of backbone atoms during 100 ns; b: The root mean square fluctuations (RMSF) of each residue from 50 to 100 ns. NTR: N-terminal region; CHC: Central hydrophobic cluster; CTR: C-terminal region

架 N 原子之间的距离概率, 以判断盐桥的形成情况。结果如图 2a 所示, 未发生修饰的 A $\beta$ 42 单体结构中的 D23 和 K28 距离小于 0.46 nm 的概率在 25% 左右, 而发生脱酰胺化修饰后的 D23 和 K28 距离小于 0.46 nm 的概率为零。结果表明, N27 发生脱酰胺化修饰后, D23 和 K28 之间距离增加, 无法形成盐桥。

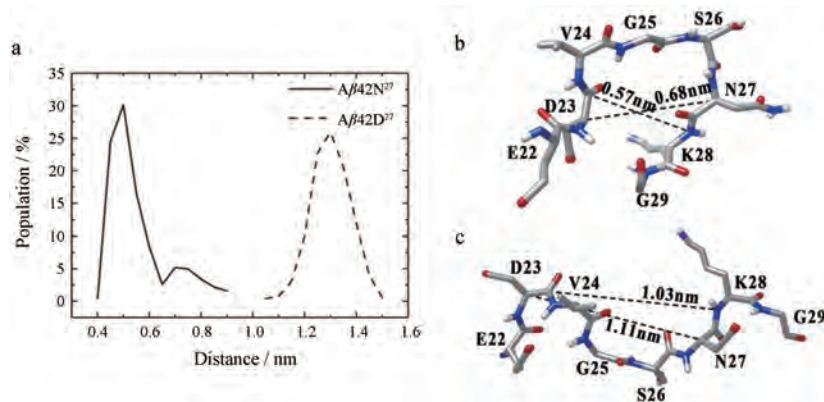
A $\beta$ 42 单体的 K28 侧链带有正电荷, D23 侧链带有负电荷, N27 侧链不带电荷, 但当 N27 侧链发生脱酰胺化修饰转变成天冬氨酸后, 则侧链带有负电荷, 与 D23 位带有相同的电荷, 将会发生排斥作用, 阻止 K28 与 D23 之间的盐桥形成。

为了进一步比较 N27 侧链发生脱酰胺化修饰之后对 D23 和 K28 周围残基结构的影响, 进行了两个模拟体系的 Turn 区的平均构象研究。通过图 2b、c 可以发现, 未修饰时的 D23 骨架 C 原子和 K28 骨架 N 原子的平均距离是 0.57 nm, 并且它们之间会形成转角结构; 当 N27 侧链发生脱酰胺化修饰时, D23 和 K28 的平均距离增至 1.03 nm, 原有的转角结构转变成比较舒展的无规卷曲结构, 并且 D23 与 D27 的平均距离也增至 1.11 nm。另外, 转角结构的改变可能会进一步引起 A $\beta$ 42 整体二级结构、三级结构以及各个区域间的相互

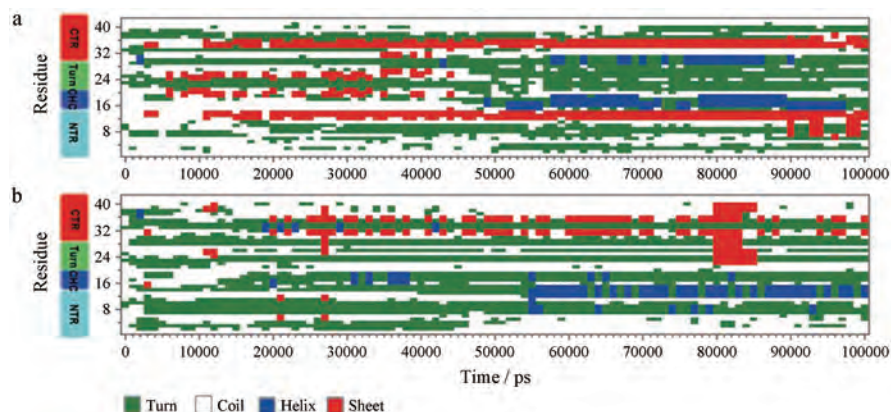
作用强度随之发生变化。

### 3 二级结构分析

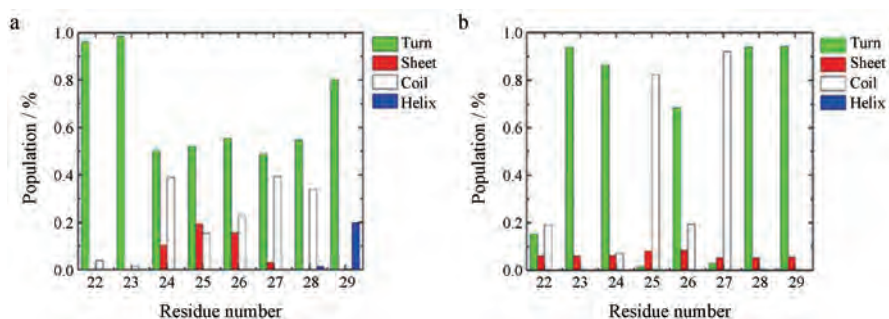
已有研究表明 A $\beta$ 42 的二级结构由无规卷曲或  $\alpha$  螺旋转变成  $\beta$  折叠对 A $\beta$ 42 进行自组装后, 进一步形成各种聚合物至关重要<sup>[32,33]</sup>。为了研究 N27 发生脱酰胺化修饰对于 A $\beta$ 42 单体形成二级结构的影响, 本文比较了两个体系在 100 ns 模拟时间内的二级结构的动态变化。结果如图 3 所示, 在整个模拟时间内, 未发生修饰的 A $\beta$ 42 单体的 CTR 区域残基 (L34~V36) 和 NTR 区域残基 (V12~H14) 在 10 ns 左右发生了由无规卷曲转变成  $\beta$  折叠的结构转变, 并且存在时间高达 75% 以上。脱酰胺化之后的 A $\beta$ 42 单体的 NTR 区域形成  $\beta$  折叠结构的存在时间小于 1%。CTR 区域残基 (I31~I32) 和 (M35~V36) 虽然形成  $\beta$  折叠结构, 但存在时间只有 40% 左右。对比两个体系可发现, 修饰后的 A $\beta$ 42 在 CTR 与 NTR 区域出现  $\beta$  折叠结构的时间较晚, 存在时间较短, 并且参与形成  $\beta$  折叠的残基数量减少。在 CHC 区域 (F19~A21), 未发生修饰的 A $\beta$ 42 单体在三种不同结构形式之间转变, 其中  $\beta$  折叠存在的时间为 15%, 形成无规卷曲的时间为 40%, 形成  $\alpha$  螺旋的时间为 20%。而当发生修饰之后, 该区域形成  $\beta$  折叠结构



**Figure 2** Comparison of the salt bridge formed between D23 and K28 in A $\beta$ 42N<sup>27</sup> and A $\beta$ 42D<sup>27</sup>. a: The distance distributions between D23 and K28; b, c: The position of residues in turn region for A $\beta$ 42N<sup>27</sup> and A $\beta$ 42D<sup>27</sup>, respectively



**Figure 3** The evolution of secondary structure elements for A $\beta$ 42N<sup>27</sup> (a) and A $\beta$ 42D<sup>27</sup> (b)



**Figure 4** Probabilities of four secondary structures formed in residues 22–29 for Aβ42N<sup>27</sup> (a) and Aβ42D<sup>27</sup> (b)

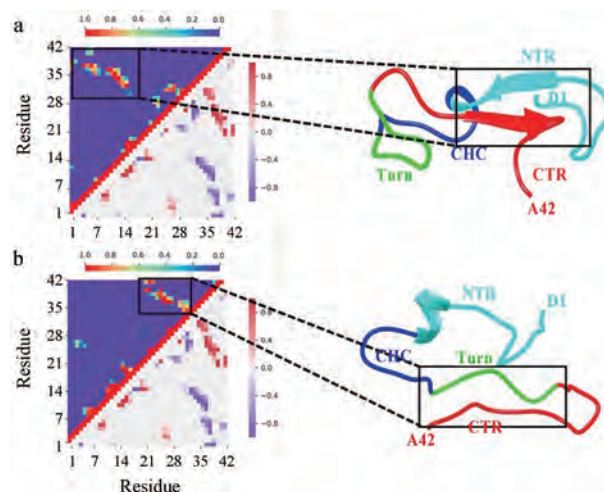
的时间小于0.05%，大部分时间以形成转角结构为主(70%)。这与之前通过RMSF分析得到的修饰后CHC区域残基波动幅度变小的结果相符合。

由于Aβ42第27位天冬酰胺位于Turn区域，因此分析该区域的结构变化对于理解Aβ42的整体构象改变至关重要。Turn区域残基形成的二级结构形式如图4所示，未发生N27修饰的Aβ42单体的二级结构主要包括无规卷曲(39%)和β转角(47%)，其邻近的残基也都主要参与形成β转角(40%以上)。当发生N27脱酰胺化修饰后，Aβ42单体的D27、G25形成的二级结构均主要是无规卷曲(92%)，而其他残基还是以形成转角结构为主。可以发现，修饰后的Aβ42的Turn区残基可以形成稳定的结构，在不同二级结构之间相互转变的概率变小，这也与脱酰胺修饰之后Turn区域残基RMSF波动较小相符。

综上所述，当27位天冬酰胺进行脱酰胺化修饰后，Aβ42单体形成的二级结构主要以无规卷曲和转角结构为主，NTR区域和CTR区域形成β折叠结构的趋势降低。

#### 4 三级结构分析

残基间的空间距离会影响其相互作用，从而进一步影响蛋白质构象。影响相互作用的因素主要来自非邻近(序列上间隔大于3)残基之间的接触，为此，本文计算了在50~100 ns时间内Aβ42链内非邻近残基之间的接触。如图5a左上三角部分显示，没有修饰的Aβ42单体中残基A30~A42侧链与残基D1-K16侧链之间的接触比较密切，该接触区域对应于Aβ42的CTR区域(L34~V36)与NTR区域(V12~H14)之间形成反向平行β折叠结构。而在图5b左上三角部分显示，在发生修饰后的Aβ42单体以上两个区域中的残基侧链之间几乎没有接触，残基A21~I32与残基V36~A42侧链之间接触比较紧密。这与发生修饰后Aβ42单体的Turn区域形成了比较舒展延伸的结构、CTR区域中残基A30~L34形成转角结构和残基V36~A42形成与Turn区域结构相平行的结构相对应。



**Figure 5** Intra chain residue contact probability matrix and the average structures of Aβ42 from the last 50 ns. The upper triangular portion in the matrix represents the normalized contacts probability for Aβ42N<sup>27</sup> (a) and Aβ42D<sup>27</sup> (b) and the lower triangular portion in the matrix is the probability differences between Aβ42N<sup>27</sup> and Aβ42D<sup>27</sup>

#### 5 CTR与NTR区域结合趋势分析

通过分析Aβ42单体三级结构发现，两个体系最主要的差异体现在CTR区域与NTR区域之间的相互接触。由于链内β折叠之间的相互作用对于Aβ42单体聚合发挥着关键作用，因此本研究从50~100 ns模拟轨迹中选取5 000帧构象，分别计算了两个体系CTR区域与NTR区域残基的结合能。通过计算得到未发生修饰的Aβ42单体的CTR区和NTR区之间的结合能为 $(-99.19 \pm 8.89) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ；而发生脱酰胺化修饰之后的Aβ42单体中两个区域之间的结合能下降为 $(-49.56 \pm 3.79) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。表明修饰之后Aβ42的CTR和NTR区域残基相互作用减弱，这也与以上两个区域残基之间距离变远的结果相符合。

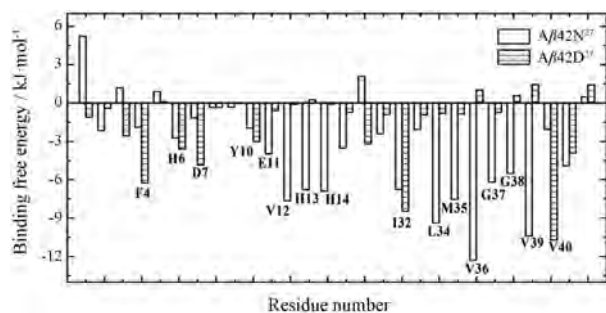
为了分析在以上两个区域内残基之间相互作用是以哪种作用方式为主，本研究进一步把结合能进行了分解，结果如表1所示，促进两个区域结合主要通过静

**Table 1** The calculated interaction free energy between residues at CTR and NTR regions and its individual components for A $\beta$ 42N<sup>27</sup> and A $\beta$ 42D<sup>27</sup>.  $\Delta E_{\text{vdw}}$ : The van der Waals energy;  $\Delta E_{\text{elec}}$ : The electrostatic energy;  $\Delta G_{\text{polar}}$ : The polar solvation energy;  $\Delta G_{\text{nonpolar}}$ : The nonpolar solvation energy;  $\Delta G_{\text{interaction.energy}}$ : The binding free energy

Complex	$\Delta E_{\text{vdw}}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta E_{\text{elec}}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta G_{\text{polar}}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta G_{\text{nonpolar}}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta G_{\text{interaction.energy}}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
A $\beta$ 42N <sup>27</sup>	-213.69 $\pm$ 0.82	-118.32 $\pm$ 1.28	260.23 $\pm$ 8.79	-26.372 $\pm$ 0.11	-99.19 $\pm$ 8.89
A $\beta$ 42D <sup>27</sup>	-63.66 $\pm$ 0.83	-7.92 $\pm$ 0.39	30.39 $\pm$ 3.71	-8.37 $\pm$ 0.11	-49.56 $\pm$ 3.79

电作用、范德华作用和非极性作用, 其中范德华作用起主要促进作用。而范德华作用也是引起这两个体系的两个区域结合能差异的最主要原因。

为了确定在结合过程中起重要作用的氨基酸, 本研究把结合能分解到每个残基上, 结果如图6所示, 在未发生修饰的 A $\beta$ 42 单体中起主要作用的残基是 V12、H13、H14、I32、L34、M35、V36、G37、V39; 而修饰之后起主要作用的残基是 I32 和 V40。可见修饰之后, NTR 区域中各个残基对于与 CTR 区域相结合的贡献变小, 这与 CTR 区域之间的距离变大有关, 从而无法与 CTR 区域形成稳定的反向平行  $\beta$  折叠结构。而 CTR 区域中的 I32 和 V40 在与 NTR 区域结合中贡献较大, 与它们形成无规卷曲后, 与 NTR 区域中的残基距离接近有关。



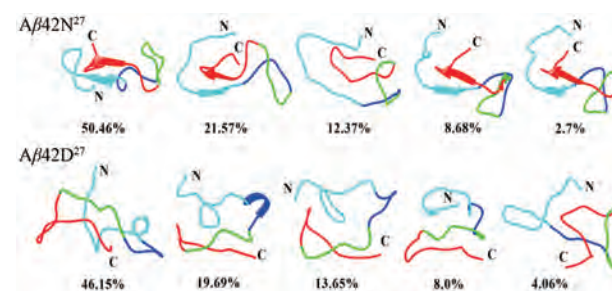
**Figure 6** Contribution of individual residues to the interaction energy between residues at CTR and NTR regions. Key residues with great contribution are indicated by one letter code

## 6 主要构象分析

为了进一步分析 A $\beta$ 42 单体在模拟过程中的主要构象, 本文对 50~100 ns 轨迹中的结构进行了聚类分析。结果表明, 未发生修饰的 A $\beta$ 42 单体结构聚类的总数是 23 类, 其中前五类构象的数目占总数的 95.78%; 而发生修饰之后的 A $\beta$ 42 单体结构的类别为 30 类, 其中前五类构象数目占总数的 91.54%。对比聚类结果可以发现, 27 位天冬酰胺进行脱酰胺化修饰可以使 A $\beta$ 42 单体的构象发生较大变化, 这与之前 RMSD 结果相符。

分别提取的两个体系前五类构象在图7中显示。通过对比未发生修饰的 A $\beta$ 42 单体结构, 可以得到以下结构特征: ① 整体结构比较稳定, 除了第三类构象外,

其他四类构象 (83.41%) 中, NTR 区域残基 V12~H14 与 CTR 区域残基 L34~V36 可以形成反向平行的  $\beta$  折叠结构, 并且  $\beta$  折叠结构区域之间易形成发夹结构; ② 后四类构象中羧基末端和氨基末端残基呈现相同方向的舒展趋势, 并且它们之间的距离比较接近。



**Figure 7** The representative structures of five most-populated conformational clusters for A $\beta$ 42N<sup>27</sup> and A $\beta$ 42D<sup>27</sup> are shown in cartoon representation and the corresponding percent is shown at the bottom of the structures. Different regions are represented by different color as follow: cyan, NTR region; blue, CHC region; green, Turn region; red, CTR region

对于发生修饰的 A $\beta$ 42 单体结构可以得到以下特征: ① 所有的构象都比较松散灵活, 含有丰富的无规卷曲结构; ② 在前两类构象 (65.84%) 中均出现  $\alpha$  螺旋结构, 其中在第一类构象 (46.15%) 中, NTR 区域中残基 E11~Q15 形成  $\alpha$  螺旋结构; 在第二类构象 (19.69%) 中, CHC 区域中残基 K16~F19 形成  $\alpha$  螺旋结构; ③ 所有构象中均未形成  $\beta$  折叠结构。另外, 羧基末端与氨基末端残基构象并未沿相同方向舒展, 它们之间的距离相对较远。

## 讨论

基础实验证实 A $\beta$ 42 的 N27 发生脱酰胺化修饰可以减慢聚合物的形成速率<sup>[15]</sup>。评估 A $\beta$ 42 单体形成聚合物能力的指标是其  $\beta$  折叠的含量, 本文通过 MD 模拟的方法证实了发生脱酰胺化修饰的 A $\beta$ 42 单体参与形成  $\beta$  折叠的残基数量减少, 并且在模拟过程中其结构从无规卷曲或  $\alpha$  螺旋到  $\beta$  折叠的转变需要的时间较未发生修饰的 A $\beta$ 42 单体变长。这表明了本研究的模拟是与实验结果相符合的。

通过分析脱酰胺化修饰和非修饰 A $\beta$ 42 单体的结

构,发现N27脱酰胺化修饰破坏了Turn区D23和K28形成盐桥的条件,同时阻止Turn区残基形成 $\beta$ 转角结构。导致发生脱酰胺化修饰的A $\beta$ 42单体大部分区域形成无规卷曲,残基RMSF值波动幅度增大,形成的 $\beta$ 折叠结构减少,尤其在CTR区域和NTR区域,两者之间无法形成稳定的反向平行 $\beta$ 折叠结构,显著影响了A $\beta$ 42单体之间的聚合作用。

之前研究已证明盐桥对于A $\beta$ 42聚合至关重要<sup>[34-36]</sup>,因此,如果破坏A $\beta$ 42单体中D23与K28之间的盐桥形成条件,就可有效抑制A $\beta$ 42单体中CTR与NTR区域形成的 $\beta$ 折叠结构,减弱A $\beta$ 42单体聚合能力。本研究结果显示,当N27发生脱酰胺化修饰,会阻碍D23与K28形成盐桥,同时提示,如果能发现可优先与A $\beta$ 42的Turn区残基相互作用的小分子,将有可能达到治疗AD的作用。

## References

- [1] Amariglio RE, Donohue MC, Marshall GA, et al. Tracking early decline in cognitive function in older individuals at risk for Alzheimer disease dementia: the Alzheimer's disease cooperative study cognitive function instrument [J]. *JAMA Neurol*, 2015, 72: 446-454.
- [2] Dziejcz T, Pera J, Klimkowicz-Mrowiec A, et al. Biochemical and radiological markers of Alzheimer's disease progression [J]. *J Alzheimers Dis*, 2016, 50: 623-644.
- [3] Association Alzheimer's. 2016 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2016, 12: 459-509.
- [4] Masters CL, Simms G, Weinman NA, et al. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985, 82: 4245-4249.
- [5] Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, et al. National Institute on Aging-Alzheimer's association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2012, 8: 1-13.
- [6] Peng Y, Li YY, Li L, et al. Progress of clinical trials in Alzheimer's disease drugs [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1185-1195.
- [7] Zou Y, Qian Z, Chen Y, et al. Norepinephrine inhibits Alzheimer's amyloid-beta peptide aggregation and destabilizes amyloid-beta protofibrils: a molecular dynamics simulation study [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10: 1585-1594.
- [8] Berk C, Paul G, Sabbagh M. Investigational drugs in Alzheimer's disease: current progress [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2014, 23: 837-846.
- [9] Long JM, Holtzman DM. Alzheimer disease: an update on pathobiology and treatment strategies [J]. *Cell*, 2019, 179: 312-339.
- [10] Zhang BY, Pang XC, Jia H, et al. Repositioning drug discovery for Alzheimer's disease based on global marketed drug data [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1214-1224.
- [11] Marcelli S, Corbo M, Iannuzzi F, et al. The involvement of post-translational modifications in Alzheimer's disease [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2018, 15: 313-335.
- [12] Kumar S, Rezaei-Ghaleh N, Terwel D, et al. Extracellular phosphorylation of the amyloid beta-peptide promotes formation of toxic aggregates during the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *EMBO J*, 2011, 30: 2255-2265.
- [13] Halim A, Brinkmalm G, Rüttschi U, et al. Site-specific characterization of threonine, serine, and tyrosine glycosylations of amyloid precursor protein/amyloid beta-peptides in human cerebrospinal fluid [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 11848-11853.
- [14] Jawhar S, Wirths O, Bayer TA. Pyroglutamate amyloid-beta (A beta): a hatchet man in Alzheimer disease [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286: 38825-38832.
- [15] Osaki D, Hiramoto H. Citrullination and deamidation affect aggregation properties of amyloid beta-proteins [J]. *Amyloid*, 2016, 23: 234-241.
- [16] Song L, Xue R, Ge P, et al. Identification of post-translational modifications of A beta peptide in platelet membranes from patients with cerebral amyloid angiopathy [J]. *J Neurol Sci*, 2017, 383: 11-17.
- [17] Kumar S, Walter J. Phosphorylation of amyloid beta (A beta) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease [J]. *Aging (Albany NY)*, 2011, 3: 803-812.
- [18] Kumar S, Singh S, Hinze D, et al. Phosphorylation of amyloid-beta peptide at serine 8 attenuates its clearance via insulin-degrading and angiotensin-converting enzymes [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287: 8641-8651.
- [19] Moloney A, Sattelle DB, Lomas DA, et al. Alzheimer's disease: insights from drosophila melanogaster models [J]. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35: 228-235.
- [20] Cynis H, Frost JL, Crehan H, et al. Immunotherapy targeting pyroglutamate-3 A beta: prospects and challenges [J]. *Mol Neurodegener*, 2016, 11, 48
- [21] Schlenzig D, Manhart S, Cinar Y, et al. Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides [J]. *Biochemistry*, 2009, 48: 7072-7078.
- [22] Alexandru A, Jagla W, Graubner S, et al. Selective hippocampal neurodegeneration in transgenic mice expressing small amounts of truncated A beta is induced by pyroglutamate-A beta formation [J]. *J Neurosci*, 2011, 31: 12790-12801.
- [23] Ahmed M, Davis J, Aucoin D, et al. Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17: 561-567.
- [24] Nguyen P, Derreumaux P. Understanding amyloid fibril nucleation and A beta oligomer/drug interactions from computer simulations [J]. *Acc Chem Res*, 2014, 47: 603-611.

- [25] Nelson R, Eisenberg D. Recent atomic models of amyloid fibril structure [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2006, 16: 260-265.
- [26] Gremer L, Scholzel D, Schenk C, et al. Fibril structure of amyloid-beta(1-42) by cryo-electron microscopy [J]. *Science*, 2017, 358: 116-119.
- [27] Margreitter C, Petrov D, Zagrovic B. Vienna-PTM web server: a toolkit for MD simulations of protein post-translational modifications [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 422-426.
- [28] Petrov D, Margreitter C, Grandits M, et al. A systematic framework for molecular dynamics simulations of protein post-translational modifications [J]. *PLoS Comput Biol*, 2013, 9: e1003154.
- [29] Reif MM, Winger M, Oostenbrink C. Testing of the GROMOS force-field parameter set 54A8: structural properties of electrolyte solutions, lipid bilayers, and proteins [J]. *J Chem Theory Comput*, 2013, 9: 1247-1264.
- [30] Yang C, Zhu XL, Li JY, et al. Exploration of the mechanism for LPFFD inhibiting the formation of beta-sheet conformation of A beta(1-42) in water [J]. *J Mol Model*, 2010, 16: 813-821.
- [31] Truong PM, Viet MH, Nguyen PH, et al. Effect of Taiwan mutation (D7H) on structures of amyloid-beta peptides: replica exchange molecular dynamics study [J]. *J Phys Chem B*, 2014, 118: 8972-8981.
- [32] Steckmann T, Bhandari YR, Chapagain PP, et al. Cooperative structural transitions in amyloid-like aggregation [J]. *J Chem Phys*, 2017, 146: 135103.
- [33] Chiti F, Dobson C M. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade [J]. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86: 27-68.
- [34] Mithu VS, Sarkar B, Bhowmik D, et al. Curcumin alters the salt bridge-containing turn region in amyloid beta(1-42) aggregates [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289: 11122-11131.
- [35] Chandra B, Mithu VS, Bhowmik D, et al. Curcumin dictates divergent fates for the central salt bridges in amyloid-beta40 and amyloid-beta42 [J]. *Biophys J*, 2017, 112: 1597-1608.
- [36] Boopathi S, Kolandaivel P. Study on the inter- and intra-peptide salt-bridge mechanism of Abeta23-28 oligomer interaction with small molecules: QM/MM method [J]. *Mol BioSyst*, 2015, 11: 2031-2041.