



РЕГУЛЯЦИЯ АГРЕГАЦИИ САМОАССОЦИИРУЮЩИХСЯ ПЕПТИДОВ НИТРОПРОИЗВОДНЫМИ АЗОЛОАЗИНА, В ТОМ ЧИСЛЕ N-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА β -АМИЛОИДНОГО ПЕПТИДА АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2019 г. О. А. Миргородская*, Ю. П. Козьмин**, А. В. Протасов*, И. Ю. Торопыгин***, В. А. Олейников**, ****, #

*ФГБУ НИИ гриппа, Санкт-Петербург, Россия

**Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, Москва ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

***Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН, Москва, Россия

****Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ (Московский инженерно-физический институт), Москва, Россия

Поступила в редакцию 27.04.2018 г.

После доработки 25.05.2018 г.

Принята к печати 08.06.2018 г.

Показана перспективность применения нитросоединений класса азолоазинов в качестве регуляторов агрегации природных пептидов, склонных к самоассоциации, на примере фрагмента β -амилоидного пептида Альцгеймера (β AP) и цитолитического пептида пчелиного яда мелиттина (Melittin). В зависимости от типа применяемого производного азолоазина происходит либо ассоциация пептида с образованием нерастворимой формы, либо ассоциация подавляется, вплоть до растворения ранее образовавшегося ассоциата. Определены участки и стехиометрия связывания азолоазинов с исследуемыми пептидами в образующихся ассоциатах. Обнаруженные эффекты объясняются уникальной способностью нитропроизводных азолоазинов диссоциировать в водных растворах с образованием стабильного ароматического аниона, имеющего электростатическое средство к основным аминокислотным остаткам молекул пептидов. Этим же свойством нитроазолоазинов была обусловлена проверка их способности проявлять регуляторные функции в процессах агрегации. Полученные данные указывают на перспективность использования нитропроизводных азолоазинов в качестве индукторов или ингибиторов агрегации β -амилоидного пептида Альцгеймера, а возможно и других пептидов, образующих амилоидные отложения.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, агрегация белков, азолоазины, количественная масс-спектрометрия

DOI: 10.1134/S013234231901010X

ВВЕДЕНИЕ

Самоассоциация пептидов, в ряде случаев сопровождающаяся их агрегацией, является достаточно распространенным явлением в биологических средах. Известно, что ряд антимикробных пептидов, таких как протегрин и мелиттин, в результате самоассоциации образуют каналы в мембранах микроорганизмов, приводя к их гибели [1–4].

Известен ряд химических веществ, способных искусственно индуцировать ассоциацию биологических полимеров. Явления как самоассоциации, так и индуцированной ассоциации (напри-

мер, за счет наночастиц [5–7]), лежат в основе возникновения целого ряда патологических процессов в организме человека. Среди них актуальна болезнь Альцгеймера, сопровождающаяся ассоциацией пептидов β AP(1–40)– β AP(1–42), наблюдаемых в организме человека в виде бляшек [8]. В этой связи представляется важным выявление веществ, которые могли бы быть ингибиторами этих процессов.

Причем существует еще альтернативная гипотеза, что отложения этих ассоциатов на стенках сосудов являются не причиной болезни, а защитной реакцией организма по предотвращению нежелательного взаимодействия β AP с тау-белком, агрегация которого приводит к деменции [9]. В этой связи индукторы, стимулирующие запуск

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 330-59-74; +7 (910) 409-84-55; эл. почта: voleinik@mail.ru).

Таблица 1. Структура использованных азолоазинов и их краткие названия, использованные в тексте данной статьи

TZ (триазид)	TZV (триазоверин)	$^2\text{H}_3\text{ }^{15}\text{N}_3$ -TZV-стандарт	TZV-A	TZV-B

Таблица 2. Характеристики пептидов, использованных в экспериментах

Пептиды		Аминокислотная последовательность	M_r
1	Мелиттин	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ-amid	2844.7
2	β AP*(1–21)	DAEFRHDSGYEVHHQK ¹⁶ [K ¹⁷]LVFF	2588.3

[#] β AP*(1–21) – аналог β AP(1–20) DAEFRHDSGYEVHHQK¹⁶LVFF.

процессов ассоциации, также могут представлять определенный медицинский интерес.

Как показали данные наших экспериментов, в качестве индукторов и ингибиторов подобных процессов могут выступать азолоазины – синтетические аналоги пуриновых оснований [10]. Одно из таких соединений, а именно натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло-[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, в настоящее время выпускается под торговым названием Триазоверин (TZV) в качестве противовирусного препарата [11–13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения влияния азолоазинов на процесс агрегации пептидов были выбраны пептиды двух типов (табл. 2). Это аналог *N*-концевого фрагмента β -амилоидного пептида Альцгеймера β AP*(1–21), с преобладанием кислых функциональных групп, и склонный к ассоциации пептид мелиттин с преобладанием основных функциональных групп. Пептиды с разной функциональной активностью были выбраны для того, чтобы понять общность воздействия азолоазинов на объекты белковой природы, не связывая это воздействие с функциональными свойствами конкретных пептидов.

В табл. 1 представлены структурные формулы азолоазинов, а в табл. 2 – аминокислотные последовательности использованных в экспериментах пептидов. Заметим, что пептид β AP*(1–21) является фрагментом β -амилоидного пептида Альцгеймера (β AP), образующего скопления в виде амилоидных бляшек в организме больных болезнью Альцгеймера, а мелиттин – положительно заряженный токсичный пептид из яда пчел. Ассоциаты последнего способны встраиваться в мембраны бактериальных клеток, формируя в их

мембранах поры, способные приводить к гибели клеток.

В водных растворах оба пептида хорошо растворимы, однако после внесения в их растворы триазоверина (TZV) все они теряют свою растворимость (табл. 3: № 1, № 5).

Влияние состава среды на агрегацию пептидов β AP*(1–21) и мелиттина в присутствии TZV, как индуктора агрегации. Азолоазины в виде своих натриевых солей начело диссоциируют в воде с образованием нейтральных растворов. Причина тому – рассредоточение отрицательного заряда аниона по всей объемной ароматической системе, благодаря чему равновесие в водном растворе сильно сдвинуто в сторону диссоциированной формы.

В случае мелиттина эксперимент проводили в бикарбонатном буфере (NH_4HCO_3) с pH 7.8 (близко к физиологическим условиям), поскольку мелиттин – основной пептид, и буфер его агрегации не мешает. Тогда как в экспериментах с β AP*(1–21) бикарбонатный буфер не использовался, поскольку β AP*(1–21) – кислый пептид и в этом буфере осадков с TZV не образует. Из-за отсутствия буфера пришлось контролировать pH среды: водный раствор β AP*(1–21) при концентрации 1 мМ имел pH = 6.5 и оставался таким же в надосадочной жидкости и после добавления TZV. Тем не менее, в отсутствии TZV оба использованных пептида растворимы в широком диапазоне pH, а поэтому эффект седиментации не может быть приписан изменению pH среды из-за смешения растворов.

Результаты экспериментов по влиянию различных добавок на агрегацию пептидов β AP*(1–21) и мелиттина в водной среде представлены в табл. 3: № 2–4, № 6–8.

Таблица 3. Изменение агрегатного состояния пептидов мелиттина и β АР*(1–21) в их 0.5 мМ водных растворах в присутствии добавок

№	0.5 мМ Мелиттин	0.5 мМ β АР*(1–21)	12.5 мМ TZV	25 мМ NH_4HCO_3	62.5 мМ NaCl	0.25% TFA	Осадок
1	+	–	+	–	–	–	+
2	+	–	+	+	–	–	+
3	+	–	+	+	+	–	+
4	+	–	+	–	–	+	+
5	–	+	+	–	–	–	+
6	–	+	+	+	–	–	–
7	–	+	+	+	+	–	–
8	–	+	+	–	–	+	+

Из полученных данных следует, что в случае пептида β АР*(1–21) присутствие 25 мМ NH_4HCO_3 препятствует агрегации, обычно вызываемой TZV (табл. 3: № 6), тогда как в случае мелиттина ни одна из использованных добавок иницированной агрегации не препятствует.

Причина столь разного поведения объясняется различием в содержании остатков основных и кислых аминокислот. Так, в составе молекулы мелиттин полностью отсутствуют кислые остатки, но присутствует множество основных, способных к взаимодействию с анионом TZV, несущим противоположный заряд. Тогда как в составе молекулы пептида β АР*(1–21), кроме основных кислот, присутствуют три кислых аминокислотных остатка, которые в ионизированной форме имеют, как и TZV, отрицательный заряд.

Этому объяснению не противоречит и тот факт, что агрегация пептида β АР*(1–21) сохраняется даже в присутствии трифторуксусной кислоты (TFA) (табл. 3: № 3, № 8), которая подавляет ионизацию остатков карбоксилсодержащих аминокислот.

Использование MALDI-MS для количественного определения содержания пептидов и TZV в смесях. Количественное определение пептидов β АР*(1–21) и мелиттин в осадках ассоциатов и надосадочной жидкости над осадками проводили с использованием масс-спектрометрического метода MALDI-MS в режиме положительных ионов, с учетом особенностей масс-спектрометрической детекции пептидов в присутствии азолазинов.

Количественное определение пептида β АР*(1–21). Для определения пептида β АР*(1–21) был получен стандарт пептида β АР*(1–21) с включенными в него атомами стабильного изотопа ^{18}O . Получение стандарта осуществляли путем изотопного обмена в сильно кислой среде, как это описано в работах [14–16]. Изотопное распределение исходного соединения и полученного из него стан-

дарта (в виде их смеси) представлено на рис. 1. Из спектра видно, что кислороды всех 5 карбоксильных групп (Glu + Asp + концевая COOH) проявили способность замещаться на изотоп ^{18}O . И, как следствие, позволило получить идеальный внутренний стандарт для количественного анализа из-за полного отсутствия перекрытия между пиктернами анализируемого вещества и стандарта.

Расчет исходной концентрации пептида проводили по данным MALDI-MS анализа. Концентрации рассчитывали из сопоставления суммарных площадей изотопных распределений ионов пептида и его смеси со стандартом с известной концентрацией, согласно методике, описанной в работах [14–16].

Количественное определение пептида мелиттина. Определение мелиттина проводили по спектрам MALDI-MS продуктов его триптического гидролиза, применяя в качестве внутреннего стандарта тех же продукты гидролиза, меченных путем изотопного обмена, изотопом по C-концевым карбоксильным группам, аналогично описанному выше подходу для β АР*(1–21).

Необходимость использования трипсинолиза обусловлена тем, что мелиттин не содержит остатков дикарбоновых аминокислот, а его C-концевая карбоксильная группа амидирована и, следовательно, в этом случае отсутствует возможность введения изотопной ^{18}O -метки в исходную молекулу путем обмена. Тогда как у продуктов трипсинолиза появляются свободные карбоксильные группы, в которую метку ввести уже можно.

Из двух продуктов предельного гидролиза выбран “маркерный” фрагмент мелиттина Mel(6–16) с $m/z = 1511.9$ с последовательностью VLTGLPALISWIK и наибольшей интенсивностью в спектре (рис. 2а). Из гидролизата, путем изотопного обмена в C-концевых карбоксильных группах, был получен меченный стандарт (рис. 2б), который добавляли к триптическому гидролизату

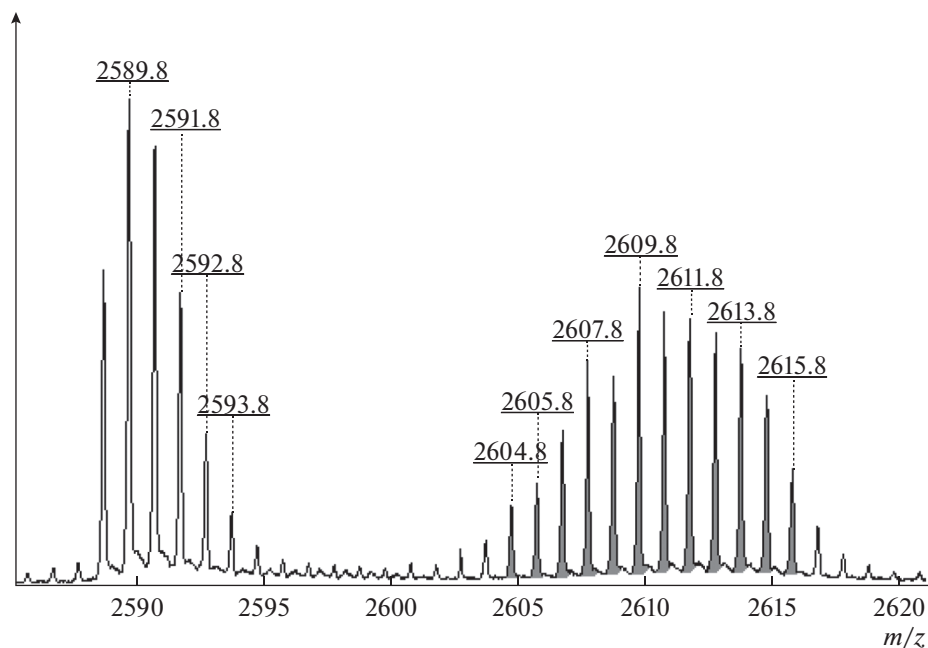


Рис. 1. Изотопное распределение пептида $\beta\text{AP}^*(1-21)$ в смеси со стандартом $[^{18}\text{O}]\beta\text{AP}^*(1-21)$.

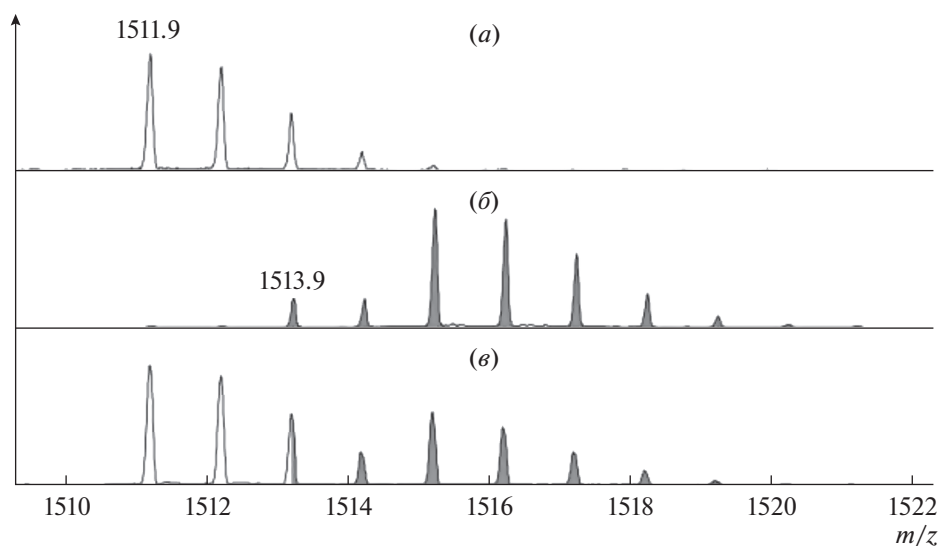


Рис. 2. Фрагмент MALDI-MS спектра триптического пептида Mel(6–16) в гидролизате (а), продукта его изотопного обмена, используемого в качестве стандарта $[^{18}\text{O}]\text{Mel}(6-16)$ (б), и смеси этого пептида со стандартом (в).

анализируемой пробы. А из соотношения интенсивностей меченных и немеченных ионов “маркерного” фрагмента (рис. 2в) рассчитывали концентрацию анализируемого пептида в пробе.

Количественное определение TZV и его аналогов. Концентрацию TZV определяли с использованием MALDI-MS в режиме отрицательных ионов, применяя в качестве стандарта его изотопно-замещенный аналог TZV-A, синтезированный с изото-

пами ^2H и ^{15}N из изотопно-замещенных реактивов (табл. 1). На рис. 3 в качестве примера представлены данные масс-спектрометрического анализа по определению его концентрации в осадке (табл. 4: № 3) Концентрацию TZV-A определяли из относительной интенсивности его иона по сравнению с ионом TZV.

Для прочих азолазинов концентрации определяли из соотношения интенсивностей их ионов

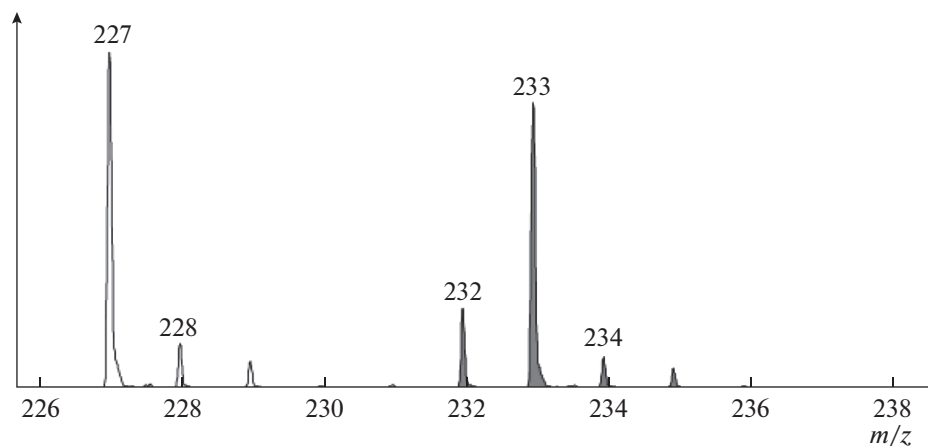


Рис. 3. Фрагмент масс-спектра с изотопными распределениями для TZV и его стандарта TZV-A (затемненные сигналы в спектре) при анализе осадка (табл. 4: № 3).

с интенсивностью ионов TZV-A по предварительно построенным калибровочным кривым. Так для TZV и TZV-A было показано экспериментально, что соотношение интенсивностей этих соединений пропорционально соотношению их концентраций, как это показано в качестве примера на рис. 3.

Изменение агрегатного состояния β AP*(1–21) и мелиттина в зависимости от количества добавленного TZV и его аналога. Разработка метода количественного анализа компонентов, участвующих в изменении агрегатного состояния пептидов в присутствии азолазинов, позволила в последующих экспериментах дополнить визуальные на-

Таблица 4. Результаты визуальной оценки изменения агрегатного состояния 0.5 мМ раствора β AP*(1–21) в присутствии азолазинов и результаты количественного определения всех компонентов смесей в осадках и надосадочных жидкостях

№	TZ	TZV	TZV-B	TZV-A	Пиридин	Осадок		
						визуально	β AP*(1–21)	TZV
							мМ	
1	5	–	–	–	–	–	–	
2	–	5	–	–	–	+	0.24	0.5
3	–	7.5	–	–	–	+	0.43	0.81
4	–	10	–	–	–	+	0.48	1.02
5	–	–	5	–	–	–	–	–
6	–	–	–	5	–	+	0.24	0.47
7	4.5	5	–	–	–	+	0.26	0.5
8	–	5	4.5	–	–	–	–	–
9	–	10	4.5	–	–	–	–	–
10	–	25	4.5	–	–	±	–	–
11	–	25	2.5	–	–	+	–	–
12	–	25	0.5	–	–	+	–	–
13	–	5	–	4.5	–	+	0.5	0.48 TZV 0.42 TZV-A
14	–	5	–	–	4.5	–	–	–
15	–	10	–	–	4.5	–	–	–
16	–	20	–	–	4.5	–	–	–
17	–	25	–	–	4.5	±	–	–
18	–	25	–	–	2.5	+	–	–

Таблица 5. Результаты визуальной оценки изменения агрегатного состояния 0.25 мМ раствора мелиттина в присутствии азолоазинов и их смесей, а также результаты количественного определения компонентов смесей и расчет соотношения пептидов и азолоазинов в осадках и надосадочных жидкостях

№	TZ	TZV	TZV-B	TZV-A	Пиридин	Осадок		
						визуально	мелиттин	TZV
							мМ	
1	5	—	—	—	—	—	—	
2	—	5	—	—	—	+	0.25	1.76
3	—	10	—	—	—	+	0.25	1.87
4	—	5	—	—	—	+	—	2.1
5	—	—	5	—	—	—	—	—
6	—	—	—	5	—	+	—	—
7	4.5	5	—	—	—	+	—	—
8	—	5	4.5	—	—	+	—	—
9	—	5	—	4.5	—	+	—	—
10	—	5	—	—	4.5	+	—	—
11	—	5	—	—	10	+	—	—
12	—	5	—	—	50	+	—	—
13	—	5	—	—	500	+	—	—

блюдения количественными данными по их содержанию в осадках и в надосадочной жидкости. Полученные результаты представлены в табл. 4 для β АР*(1–21), а в табл. 5 для мелиттина. В случае пептида β АР*(1–21) эксперименты проводили в водных растворах, а в случае мелиттина в растворе бикарбонатного буфера (25 мМ NH_4HCO_3). Условия выбраны с учетом результатов, ранее представленных в табл. 3.

Прежде всего, была оценена способность аналогов TZV вызывать агрегацию обоих пептидов в сопоставимых условиях. Из полученных данных следует, что, помимо TZV, агрегацию пептида β АР*(1–21) способен вызывать еще и TZV-A (табл. 4: № 6, 13). Тогда как TZV-B, напротив, подавляет агрегацию, вызываемую TZV, будучи добавленным в концентрации 20–25% от концентрации последнего (табл. 4: № 8–12). Кроме того, образующийся осадок при агрегации пептида β АР*(1–21) с TZV, нерастворимый в воде без буфера (25 мМ NH_4HCO_3), хорошо растворяется в водном растворе с TZV-B.

В отношении мелиттина наблюдается схожая картина — агрегацию по-прежнему вызывают TZV и TZV-A (табл. 5: № 2, 4, 6), тогда как TZV-B и TZV агрегацию не вызывают (табл. 5: № 1, 5). Однако в этом случае TZV-B при сопоставимых концентрациях агрегацию не подавляет (табл. 5: № 8).

Выявленная способность TZV-B ингибировать агрегацию может быть объяснена тем, что это соединение обладает большей ароматичностью из-за замены в пятичленном кольце атома N

на С. И если ароматичность оказывается решающей в ингибировании агрегации, тогда аналогичным действием в качестве конкурента за связывание с TZV должен обладать, например, пиридин.

Проверка этой гипотезы была выполнена экспериментально путем добавления пиридина в опытах с пептидом β АР*(1–21) (табл. 4: № 14–18) и с мелиттином (табл. 5: № 10–13). Из полученных результатов следует, что пиридин оказывает ингибирующее действие только на агрегацию пептида β АР*(1–21), но не влияет на агрегацию мелиттина. Причем, ингибирующее действие TZV-B и пиридина начинает проявляться при достижении мольного отношения к TZV, близкого к единице (табл. 5: № 10–13). Т.е. одна молекула ингибитора нейтрализует действие одной молекулы индуктора.

Определение соотношения пептидов β АР*(1–21) и мелиттина с азолоазинами в осадках. Для количественного определения соотношений компонентов в осадках для каждого из пептидов выбирались соотношения, близкие к достаточным для агрегации пептидов, без большого избытка TZV.

Состав осадков, образующихся в процессе агрегации, практически не зависит от избытка реагентов и составляет 2 молекулы TZV на одну молекулу β АР*(1–21) и (табл. 4: № 2–4). Так же ведет себя и TZV-A (табл. 4: № 6). При одновременном добавлении смеси TZV и TZV-A в осадке присутствуют оба азолоазина с небольшим преимуществом TZV (табл. 4: № 13).

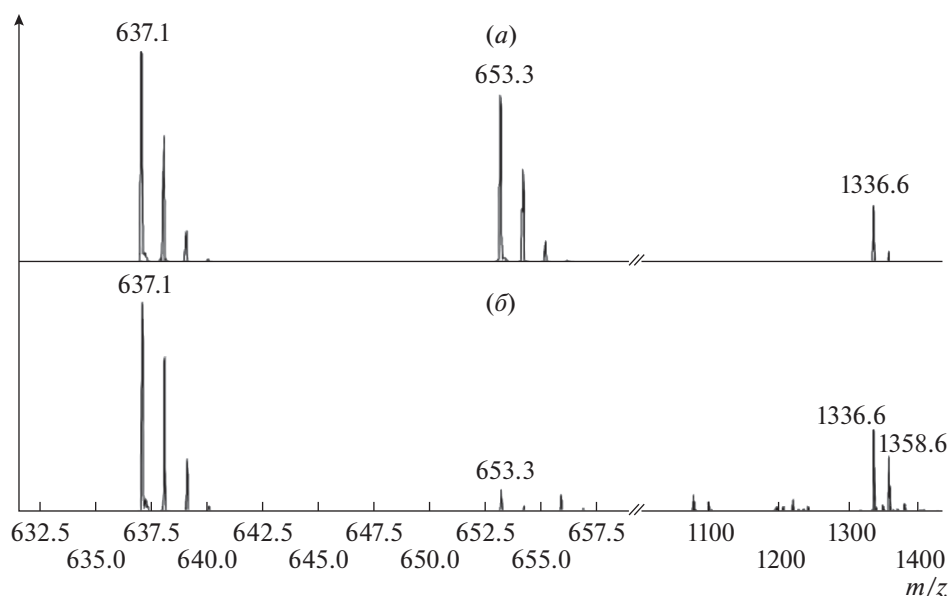


Рис. 4. Масс-спектр триптического гидролизата пептида β AP*(1–21) до (а) и после (б) добавления TZV.

В случае мелиттина образуется осадок, в котором на одну молекулу мелиттина приходится около 6 молекул TZV (табл. 5: № 2–3).

Определение участков связывания пептида β AP*(1–21) с TZV. Наличие основных кислот в последовательности пептида позволило использовать трипсин для получения его более коротких фрагментов. В полученном гидролизате (30 мин гидролиза) зарегистрировано три основных пептида: β AP*(1–5) – DAEFR с $m/z = 637.17$; β AP*(6–16) HDSGYEVNHQK с $m/z = 1336.6$ и его ион с Na с $m/z = 1358.6$, а также пептид β AP*(17–21) KLVFF с $m/z = 653.27$ (рис. 4а).

При добавлении раствора TZV к продуктам трипсинолиза β AP*(1–21) исчезает практически только пептид KLVFF с $m/z = 653.27$ (рис. 4а). Этот эффект хорошо виден на рис. 4б в сравнении с фрагментами β AP*(1–5) с $m/z = 637.17$, и β AP*(6–16) с $m/z = 1336.6$, которые остаются в растворе.

Из полученных данных следует, что в пептиде β AP*(1–21) центром связывания с TZV является участок KLVFF. В этом фрагменте хорошо сочетается наличие положительного заряда у Lys (K) и двух ароматических аминокислот – Phe-Phe (FF) для связывания с TZV, имеющим отрицательный заряд и ароматическую часть для стеккинга с FF.

Определение участков связывания TZV с мелиттином. Для выявления участков связывания, определяющих агрегацию мелиттина, была использована особенность его масс-спектрометрической детекции в присутствии TZV. Она заключалась в том, что при нанесении на мишень смеси пептидов с TZV, агрегированные пептиды в масс-

спектрах себя не проявляют. В качестве примера на рис. 5 представлен спектр природного мелиттина, содержащего гомологичные примеси. Видно, что в присутствии TZV мелиттин не регистрируется в связи с его агрегацией, однако в спектре по-прежнему присутствуют примеси, представляющие собой укороченные гомологи мелиттина, неспособные к агрегации.

Из представленных данных следует, что в спектре коммерческого препарата, мелиттин регистрируется в виде интенсивного молекулярного иона с присутствием некоторого количества примесных ионов, представляющих собой укороченные пептидные цепочки, по-видимому, представляющие собой промежуточные продукты его биосинтеза. В присутствии TZV ион мелиттина из спектра исчезает, тогда как примесные ионы остаются, и доминантным становится один из примесных ионов с $m/z = 2585$. Аминокислотный состав последнего определить не удалось. Одновременно существенно возрастает относительная интенсивность остальных примесных ионов, многие из которых представляют собой гомологи мелиттина, укороченные с C-конца (табл. 6), очевидно не участвующие в образовании недетектируемых ассоциатов.

Для определения в мелиттине аминокислотных последовательностей, участвующих в связывании или ассоциации при взаимодействии с TZV, использовали триптические фрагменты мелиттина. С этой целью был получен триптический гидролизат мелиттина, MALDI-спектр которого представлен на рис. 6б. Затем к полученному гидролизату был добавлен TZV. Как следует из сравнения спектров на рис. 6б и рис. 6в,

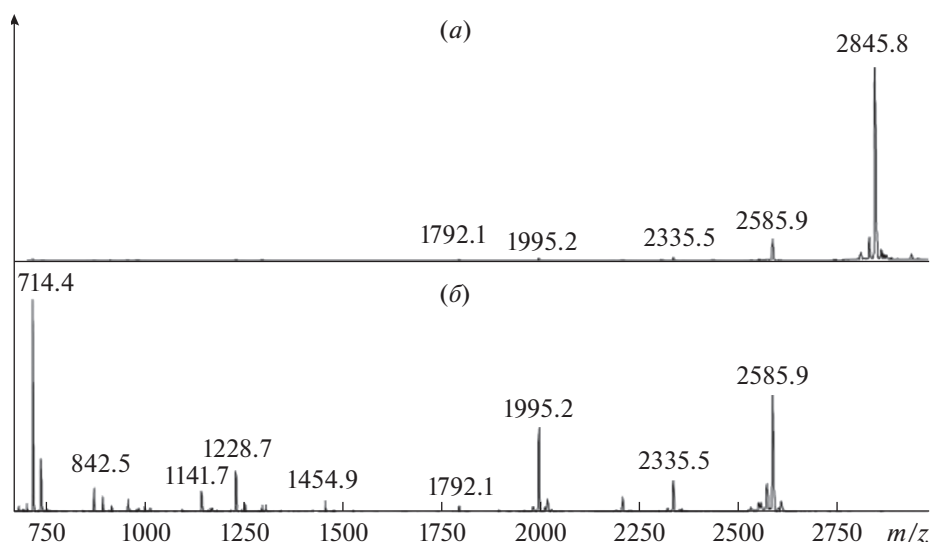


Рис. 5. MALDI-MS масс-спектр мелиттина (а) и его смеси с TZV (б).

при добавлении TZV в спектре исчез фрагмент GIGAVLKVLTTGLPALISWIKR (ион с $m/z = 2306.4$), тогда как его составные фрагменты – GIGAVLK (в виде пары ионов $M + H^+$ с $m/z = 657.4$ и $M + Na^+$ с $m/z = 679.4$) и VLTTGLPALISWIKR (в виде пары ионов $M + H^+$ с $m/z = 1668.0$ и $M + Na^+$ с $m/z = 1690.0$) остались в растворе. Кроме того, в растворе остался пептид VLTTGLPALISWIK (в виде пары ионов $M + H^+$ с $m/z = 1511.9$ и $M + Na^+$ с $m/z = 1533.9$).

В области низких значений m/z , в растворе, в присутствии TZV, виден весь спектр пептидов,

Таблица 6. Значения m/z (молекулярная масса протонированного иона MH^+) и пептидные фрагменты мелиттина, зарегистрированные при добавлении TZV к мелиттину на мишени (см. рис. 5)

№	MH^+	Пептид	Фрагмент
1	714.4	Mel(22–26)	RKRQQ
2	842.5	Mel(21–26)	KRKRQQ
3	955.6	Mel(20–26)	IKRKRQQ
4	1141.7	Mel(19–26)	WIKRKRQQ
5	1228.7	Mel(18–26)	SWIKRKRQQ
6	1454.9	Mel(16–26)	LISWIKRKRQQ
7	1525.9	Mel(15–26)	ALISWIKRKRQQ
8	1792.1	Mel(12–26)	GLPALISWIKRKRQQ
9	1995.2	Mel(10–26)	TTGLPALISWIKRKRQQ
10	2207.3	Mel(8–26)	VLTTGLPALISWIKRKRQQ
11	2335.5	Mel(7–26)	KVLTTGLPALISWIKRKRQQ
12	2845.8	Mel(1–26)	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ

содержащих *N*-концевые пептиды: RKRQQ ($m/z = 558.3$ и $m/z = 430.2$), оставшиеся в растворе. Из этого следует, что они не осаждаются в присутствии TZV.

Полученный результат свидетельствует о том, что участком связывания мелиттина с TZV, является протяженный участок Mel(1–22), тогда как более короткие фрагменты Mel(1–7), Mel(8–22) и Mel(23–26) с TZV не связываются.

На примере двух типов функционально значимых пептидов – пептида из *C*-концевой последовательности пептида Альцгеймера и “катионного” пептида мелиттина, выявлено, что азолоазины (TZV и некоторые его аналоги) индуцируют самоассоциацию и агрегацию пептидов.

Мелиттин и β AP*(1–21) отчетливо проявляют особенности взаимодействия с TZV и его аналогами. Можно полагать, что эти особенности обусловлены существенными различиями их аминокислотного состава.

Показано, что в образующихся нерастворимых ассоциатах существенно отличаются молярные соотношения пептида и TZV. На 1 молекулу β AP*(1–21) приходится 2 молекулы TZV, тогда как 1 молекулу мелиттина их приходится 6. Если учесть, что ароматическая система аниона TZV имеет отрицательный заряд на одном из атомов N (формула в табл. 1), то можно предположить, что ее взаимодействие с пептидами, в первую очередь, будет определять электростатическим взаимодействием с основными аминокислотами. Можно ожидать, что электростатическое взаимодействие зависит от микроокружения вблизи предполагаемых сайтов связывания. В табл. 7 наглядно представлен баланс основных и кислых аминокислотных остатков в этих пептидах в срав-

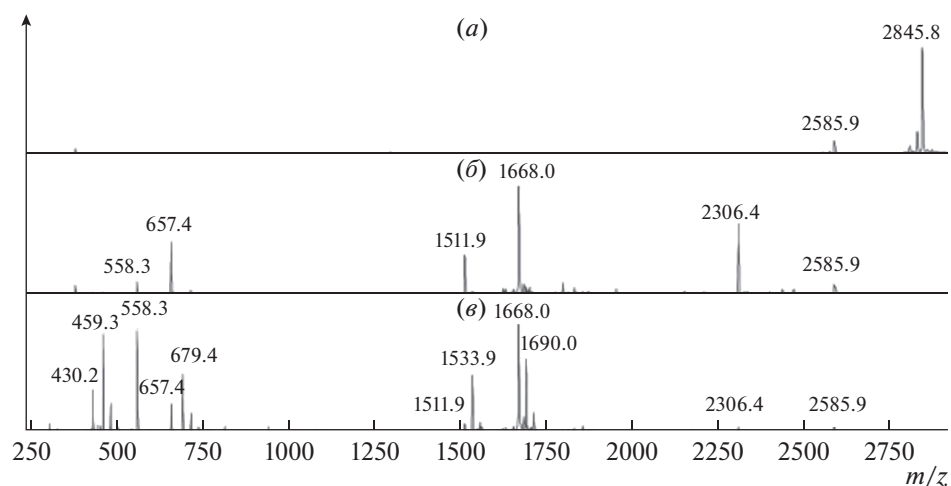


Рис. 6. Результаты масс-спектрометрического анализа мелиттина (а) и продуктов его триптического гидролиза до (б) и после (в) добавления TZV.

нении с числом молекул TZV, приходящих на одну молекулу пептида в осадке.

В пептиде β AP*(1–21), с учетом *N*-концевой аминокислоты и двух основных аминокислот (2Lys + Arg + NH₂), имеют место 4 потенциальных центра связывания, два из которых дезактивированы: *N*-концевая аминокислотная группа Asp¹ дезактивирована близостью боковой карбоксильной группы того же остатка, а основная группа Arg⁵ дезактивирована своим ближайшим микроокружением (3 кислые группы по соседству: у остатков Glu¹ + Asp³ + Glu⁷). В итоге у пептида β AP*(1–21) остаются лишь 2 возможных центра связывания – Lys¹⁵ и Lys¹⁶, а у его аналога β AP – только один Lys¹⁵ (табл. 2).

Таким образом для агрегации мелиттина в присутствии TZV необходима полная последовательность, содержащая 5 основных аминокислот и *N*-концевую аминокислотную группу. При этом в образовании ассоциатов участвуют уже 6–7 молекул TZV. Тогда как для агрегации β AP*(1–21) достаточно наличие короткой последовательности KLVFF.

Кроме того, существенным различием является разный эффект воздействия пиридина на ассоциацию этих пептидов в присутствии TZV: пири-

дин не препятствует ассоциации β AP*(1–21), но не мешает ассоциации мелиттина.

Аналогично воздействию пиридина, по-разному проявляется и влияние TZV-B на ассоциацию пептидов в присутствии TZV. Добавление TZV-B в существенно меньших концентрациях, чем TZV, препятствует агрегации β AP*(1–21), но не оказывает влияния на агрегацию мелиттина. Кроме того, замечено, что TZV-B не только препятствует образованию нерастворимых ассоциатов β AP*(1–21) с TZV, но и способен их растворять. Из экспериментов следует, что TZV-B конкурирует с TZV за центры связывания β AP*(1–21), участвующие в образовании ассоциатов.

Оценивая результаты влияния всех использованных азолоазинов на агрегацию обоих пептидов (см. табл. 4, 5) можно отметить, что способность вызывать агрегацию β AP*(1–21) присуща TZV и TZV-A примерно в равной мере, судя их соотношению в составе осадка. Тогда как TZV не влияет на агрегацию и не препятствует ассоциации β AP*(1–21) в присутствии TZV. Однако в случае мелиттина TZV может способствовать ассоциации. Важно заметить, что азолоазины в разной степени способны к комплексообразованию с обоими типами пептидов, но их действие опре-

Таблица 7. Сравнение аминокислотного состава вблизи возможных центров связывания пептидов с TZV и их соотношения в осадке

Пептид	Состав осадка: отношение TZV/пептид	Число основных групп: Lys + Arg + концевая NH ₂	Число кислых групп: Glu + Asp + концевая COOH
β AP*(1–21)	2 : 1	Всего: 2 + 1 + 1 = 4 из них активных: 2 + 0 + 0 = 2	2 + 2 + 1 = 5
Мелиттин	6 : 1–7 : 1	3 + 2 + 1 = 6	0 + 0 + 0 = 0

деляется исключительно свойствами самих пептидов.

Таким образом, в результате выполненных исследований:

(1) Определен участок и стехиометрия связывания TZV с β AP*(1–21). Показано, что TZV связывается с β AP*(1–21) на гидрофобном участке β AP*(17–21) – KLVFF. Связывание индуцирует процесс агрегации пептида и образование осадка с содержанием TZV и β AP*(1–21) в соотношении 2 : 1.

(2) Определен участок и стехиометрия связывания TZV с мелиттином. Показано, что агрегацию мелиттина индуцирует связывание с молекулами TZV на участке *N*-концевого фрагмента полипептидной цепи мелиттина (1–22) – GIGAVLKVLTTGLPALISWIKR. Стехиометрия связывания TZV с мелиттином в интервале 6 : 1–7 : 1.

(3) Показано, что близкое производное TZV – TZV-A, индуцирует агрегацию аналогичным TZV образом.

(4) Обнаружено, что производное TZV-B, с большей, по сравнению с TZV ароматичностью, не только не ингибирует агрегацию β AP*(1–21) под воздействием TZV, но и способствует растворению уже образовавшего осадка из агрегированных молекул β AP*(1–21). Показано, что решающим для этого свойства является ароматичность соединения, что продемонстрировано на примере ингибирования агрегации пиридином. Принципиально важным представляется факт, что указанные соединения способны к растворению осадка, содержащего амилоидный пептид β AP*(1–21), но не меллитин. Это указывает на направленность воздействия этих соединений на участок β AP*(17–21) – KLVFF, опосредующий образование нерастворимых фибрилл, вызывающих болезнь Альцгеймера.

В целом, настоящая работа является важным этапом на пути понимания процессов формирования нерастворимых агрегатов из полипептидов и поиска соединений, способных ингибировать процессы агрегации и даже растворять такие агрегаты. Кроме того, отметим, что исследования взаимодействия азолоазинов с пептидами стимулируют работы по созданию новых модифицированных форм азолоазинов в качестве перспективных регуляторов агрегации пептидов, участвующих в формировании амилоидоза, в том числе и болезни Альцгеймера.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пептид β AP*(1–21) был синтезирован компанией “Verta Ltd”. Мелиттин ($\geq 85\%$ HPLC) от компании “Sigma”, трипсин от компании “Promega”.

Азолоазины были синтезированы и любезно предоставлены профессором В.П. Русиновым из

Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина. H_2^{18}O (97% ^{18}O) использовалась от Sigma.

Масс-спектрометрические измерения и расчеты. Масс-спектры получены с помощью масс-спектрометра Ultraflex II MALDI-ToF/ToF (Bruker Daltonics, Германия), оборудованного Nd:YAG лазером (neodymium-doped yttrium aluminum garnet; Nd:Y₃Al₅O₁₂).

Пептиды детектировали в виде положительных ионов с использованием в качестве матрицы α -циано-4-гидроксикоричной кислоты. Точность измерения моноизотопных масс была не хуже 25 миллионный долей (ppm).

Азолоазины детектировали в виде отрицательных ионов с использованием в качестве матрицы α -циано-4-гидроксикоричная кислоты.

Количественное определение пептида β AP*(1–21) в осадках проводили с использованием ^{18}O -меченного стандарта β AP*(1–21), после растворения осадка в 25 мМ NH_4HCO_3 (pH = 7.8). Осадок отделяли в 25 мМ NH_4HCO_3 (pH = 7.8). К аликвоте анализируемого раствора добавляли раствор стандарта. Количество пептида в осадке рассчитывали из сопоставления суммарных площадей изотопного распределения в масс-спектре анализируемого пептида и его стандарта с учетом известной концентрации стандарта, согласно методике, описанной в работах [14–16].

Получение стандарта пептида β AP*(1–21). 20 мкл пептида с концентрацией 10^{-4} М высушивали в вакуумной центрифуге, растворяли в смеси 18 мкл H_2^{18}O + 2 мкл 100% TFA и инкубировали в течение 90 минут при 70°C. Реакционную смесь высушивали в вакуумной центрифуге, а затем растворяли в воде. Смесь использовали для добавления к анализируемым образцам в качестве стандарта.

Триптический гидролиз β AP*(1–21). К 50 мкл пептида с концентрацией 10^{-5} М в 50 мМ NH_4HCO_3 (pH 7.8) добавляли 5 мкл раствора трипсина с концентрацией 0.05 мг/мл. Смесь инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 10 мкл 2% TFA. Полученную реакционную смесь высушивали в вакуумной центрифуге.

Триптический гидролиз мелиттина. К 20 мкл раствора мелиттина с концентрацией 10^{-5} М в 100 мМ NH_4HCO_3 (pH 7.8) добавляли 5 мкл трипсина с концентрацией 0.05 мг/мл. Смесь инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Гидролиз контролировали масс-спектрометрически до образования пептида в качестве основного продукта гидролиза пептида VLTTGLPALISWIK.

Получение стандарта из триптического гидролизата мелиттина. Гидролизат высушивали в ваку-

умной центрифуге, образец перерастворяли в смеси 18 мкл H_2^{18}O + 2 мкл 100% TFA и инкубировали в течение 90 мин при 70°C. Продукты изотопного обмена гидролизата высушивали, растворяли в воде и использовали в качестве стандарта.

Количественное определение мелиттина в осадках. Осадки, содержащие мелиттин (табл. 4) отделяли центрифугированием и растворяли в 20 мкл 50% ацетонитрила. К полученным растворам добавляли 20 мкл раствора трипсина (0.02 мг/мл в 50 мМ NH_4HCO_3) и выдерживали 24 часа при комнатной температуре. Полученные гидролизаты смешивали со стандартом. И из соотношения изотопных распределений, относящихся к анализируемому пептиду и его стандарту с известной концентрацией, рассчитывали количество мелиттина в осадке.

Количественное определение TZV проводили с использованием в качестве стандарта его аналога с изотопами ^2H и ^{15}N , включенных в процессе его синтеза. Для TZV-A концентрацию оценивали из его относительной интенсивности по сравнению с TZV. Определение проводили в осадках с мелиттином после их растворения в 50% ацетонитриле в 25 мМ NH_4HCO_3 , и в осадках с пептидом $\beta\text{AP}^*(1-21)$, растворенных в 100 мМ NH_4HCO_3 .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе исследования были проведены фрагментом βAP , включающим амфифатический заряженный *N*-конец βAP и центральную гидрофобную область $\beta\text{AP}^*(17-21)$ – LVFFA, без гидрофобного *C*-конца. Как показали предыдущие исследования, именно эта центральная гидрофобная область играет ключевую роль в агрегации βAP [17–20], именно с этого участка начинается процесс образования фибрилл [9]. Яркой особенностью этой области является наличие двух остатков фенилаланина (Phe^{19} и Phe^{20}). Известно, что ароматические аминокислоты встречаются во многих белках, которые самоорганизуются и объединяются, вызывая болезни человека [21]. Причем в начале образования фибрилл основную роль играет Phe^{19} , тогда как присутствие Phe^{20} несколько замедляет агрегацию [23, 24].

Полученные нами данные по взаимодействию TZV и его аналогов с $\beta\text{AP}^*(1-21)$ также подтверждают имеющиеся данные [23, 24] о роли участка Phe^{19} – Phe^{20} в процессах как индукции агрегации, так и ее ингибирования. В целях предотвращения этой агрегации ранее уже предлагались соединения этой агрегации ранее уже предлагались соединения, главным образом пептидной природы, нацеленные на блокирование этого участка [25]. Выгодным свойством TZV и его аналогов в качестве возможных регуляторов агрегации является

их высокая стабильность в биологических средах по сравнению с пептидами.

Для TZV показана его низкая токсичность, а потому не следует ожидать высокой токсичности и от его аналогов. Тем более что по своей природе все они являются близкими родственниками природных пуринов и ксантинов. А потому потенциально могут быть положены в основу разработок по созданию фармацевтических средств для ингибирования фибриллогенеза во всех его аспектах.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, Соглашение № 14.604.21.0180, уникальный идентификационный номер проекта RFMEFI60417X0180 (методики количественной масс-спектрометрии в определении характеристик ассоциатов), при поддержке грантов РФФИ 17-00-00394 и 18-04-00893 (определение сайтов связывания). Авторы благодарят профессора В.П. Русинова из Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина за предоставленные образцы азолозинов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bello J., Bello H. R., Granado, E.* // Biochemistry. 1982. V. 21. P. 461–465.
2. *Quay S.C., Condie C.C.* // Biochemistry. 1983. V. 22. P. 695–700.
3. *Shai Y.* // Biopolymers. 2002. V. 66. P. 236–248.
4. *Bechinger B.* // J. Membr. Biol. 1997. V. 156. P. 197–211.
5. *Wu W.H., Sun X., Yu Y.P., Hu J., Zhao L., Liu Q., Zhao Y.F., Li Y.M.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. V. 373(2). P. 315–318.
6. *Stsiapura V., Sukhanova A., Baranov A., Artemyev M., Kulakovich O., Oleinikov V., Pluotl M., Cohenl J.H.M., Nabiev I.* // Nanotechnology. 2006. V. 17(2). P. 581–587.
7. *Melnikau D., Savateeva D, Lesnyak V., Gaponik N., Fernandez Y.N., Vasilevskiy M.I., Costa M.F., Mochalov K.E., Oleinikov V., Rakovich Y.P.* // Nanoscale. 2013. V. 5(19). P. 9317–9323.
8. *Murphy M.P., LeVine H. 3rd.* // J. Alzheimers Dis. 2010. V. 19(1). P. 311.
9. *Perez M., Cuadros R., Benítez M.J., Jimenez J.S.* // J. Alzheimers Dis. 2004. V. 6(5). P. 461–467.
10. *Русинов В.Л., Петров А.Ю., Постовский И.Я.* // Химия гетероциклических соединений. 1980. С. 1283–1285.
11. *Шестакова Т.С., Халымбаджа И.А., Деев С.Л., Ельцов О.С., Русинов В.Л., Шенкарев З.О., Арсеньев А.С., Чупахин О.Н.* // Известия АН, Серия химическая. 2011. С. 714–717.

12. Чупахин О.Н., Русинов В.Л., Уломский Е.Н., Чарушин В.Н., Петров А.Ю., Киселев О.И. // Патент РФ 2330036. 2008.
13. Чупахин О.Н., Русинов В.Л., Уломский Е.Н., Чарушин В.Н., Петров А.Ю., Киселев О.И. // Патент РФ № 2294936. 2007.
14. Козьмин Ю.П., Манойлов А.В., Серебрякова М.В., Миргородская О.А. // Биоорганическая химия. 2011. Т. 37(6). С. 793–806.
15. Kozmin Yu.P., Manoilov A.V., Serebryakova M.V., Mirgorodskaya O.A., // RJBC 2011. V. 37(6) P. 719–731.
16. Toropygin I.Y., Kugaevskaya E.V., Mirgorodskaya O.A., Elisseeva Y.E., Kozmin Y.P., Popov I.A., Nikolaev E.N., Makarov A.A., Kozin S.A. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2008. V. 22. P. 231–239.
17. Esler W.P., Stimson E.R., Ghilardi J.R., Lu Y.A., Felix A.M., Vinters H.V., Mantyh P.W., Lee J.P., Maggio J.E. // Biochemistry. 1996. V. 35. P. 13914–13921.
18. Tjernberg L.O., Callaway D.J., Tjernberg A., Hahne S., Lilliehook C., Terenius L., Thyberg J., Nordstedt C. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 12619–12625.
19. Hilbich C., Kisterswoike B., Reed J., Masters C.L., Beyreuther K. // J. Mol. Biol. 1992. V. 228. P. 460–473.
20. De Groot N.S., Aviles F.X., Vendrell J., Ventura S. // FEBS J. 2006. V. 273. P. 658–668.
21. Gazit E. // FASEB J. 2002. V. 16. P. 77–83.
22. Cukalevski R., Boland B., Frohm B., Thulin E., Walsh D., Linse S. // ACS Chem. Neurosci. 2012. V. 3(12). 1008–1016.
23. Armstrong A.H., Chen J., McKoy A.F., Hecht M.H. // Biochemistry. 2011. V. 50. P. 4058–4067.
24. Creighton T.E. // Proteins: Structures and Molecular Properties. 2nd ed., Freeman W.H., New York. P. 4 and P. 256.
25. Funke S.A., Willbold D. // Current Pharmaceutical Design. 2012. V. 18. P. 755–767.

Regulation of the Aggregation of Self-Associated Peptides, Including N-Terminal Fragments of Alzheimer's β -Amyloid Peptide, by Derivatives of Azoloazine

O. A. Mirgorodskaya*, Y. P. Kozmin**, A. D. Protasov*,
I. Y. Toropygin***, and V. A. Oleinikov**, ****, #

#Phone: +7 (495) 330-59-74; +7 (910) 409-84-55; e-mail: voleinik@mail.ru

*Research Institute of Influenza, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

**Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences,
ul. Mikluho-Maklay, 16/10, Moscow, 117997 Russia

***Orekhovich Scientific Research Institute of Biomedical Chemistry, RAMS, Moscow, Russia

****National Research Nuclear University MEPHI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russia

Potential of the nitro-compounds of azoloazins' class as regulators of aggregation of natural self-associating peptides, e.g., fragments of Alzheimer's β -amyloid peptide and cytolytic peptide bee venom melittin is demonstrated. Depending on the type of azoloazine derivative used, either insoluble form of a peptide is created, or peptide association is suppressed, up to the peptide associates dissolution. The sites and stoichiometry of azoloazines binding with both peptides and associates formation are determined. These effects are explained by a unique ability of nitro-derivatives azoloazines dissociate in aqueous solutions to form a stable aromatic anion with electrostatic affinity to basic amino acid residues of the peptide molecule. Therefore the nitro derivatives of azoloazines are the perspective objects for association/dissociation processes regulation of β -amyloid peptides. The data presented, indicate a perspective development azoloazinov-based compounds, capable of to act not only as inhibitors of aggregation of amyloid β -peptide of Alzheimer disease, but also other peptides which can form amyloid deposits.

Keywords: Alzheimer's disease, azoloazines, protein self-association, quantitative mass spectrometry