

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ  
АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ

УДК 577.112.7

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ Н6R И D7N НА МОДУЛИРОВАНИЕ ЦИНК-ИНДУЦИРОВАННОЙ АГРЕГАЦИИ АМИЛОИДА- $\beta$  ГЕПАРИНОМ

© 2019 г. С. П. Радько<sup>a, b, \*</sup>, С. А. Хмельва<sup>b</sup>, Я. Ю. Киселёва<sup>c</sup>,  
С. А. Козин<sup>a</sup>, В. А. Митькевич<sup>a</sup>, А. А. Макаров<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

<sup>b</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, 119121 Россия

<sup>c</sup>Российский научный центр рентгенорадиологии, Москва, 117485 Россия

\*e-mail: radkos@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.01.2019 г.

После доработки 30.01.2019 г.

Принята к публикации 19.02.2019 г.

Ионы цинка и гликозаминогликаны входят в состав амилоидных отложений и могут модулировать агрегацию  $\beta$ -амилоидного пептида (А $\beta$ ), которая рассматривается как ключевое событие в патогенезе болезни Альцгеймера. С помощью метода корреляционной спектроскопии исследовано влияние мутаций Н6R и D7N в металлсвязывающем домене А $\beta$ 42 на модулирование цинк-индуцированной агрегации пептида таким гликозаминогликаном, как гепарин. Показано, что мутация Н6R снижает, а D7N повышает способность А $\beta$ 42 к агрегации в присутствии ионов цинка. Также установлено, что мутация Н6R снижает, а D7N усиливает модулирующий эффект гепарина. Различия во влиянии мутаций на модулирующий эффект гепарина связаны с координацией ионов цинка в металлсвязывающем домене мутантных пептидов. Это предполагает определяющую роль анионсвязывающих сайтов, формируемых комплексами ионов цинка с металлсвязывающим доменом А $\beta$ , во взаимодействии гепарина с цинк-индуцированными агрегатами пептида.

**Ключевые слова:** болезнь Альцгеймера,  $\beta$ -амилоид, цинк, агрегация, гепарин

DOI: 10.1134/S0026898419060144

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) – прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, затрагивающее десятки миллионов человек. Возникновение и развитие БА связывают, как правило, с переходом  $\beta$ -амилоидного пептида (А $\beta$ ) из мономерного состояния в агрегированное, что запускает цепь патогенных молекулярных событий [1]. Однако причины и молекулярные механизмы этого перехода остаются неясными. Предполагается, что агрегация А $\beta$  может опосредоваться ионами цинка ( $Zn^{2+}$ ) [2, 3]. Действительно, *in vivo* процесс агрегации А $\beta$  приводит к формированию в паренхиме головного мозга отложений А $\beta$ , содержащих в значительном количестве цинк [4, 5]. Известно также, что  $Zn^{2+}$  вызывает быструю агрегацию А $\beta$  *in vitro* [2, 3], которая включает две стадии – формирование высокомолекулярных олигомеров А $\beta$  как первый шаг, и последующую ассоциацию этих олигомеров в крупные агрегаты микронного размера [6].

Наряду с  $Zn^{2+}$ , в состав амилоидных отложений входят протеоглики, содержащие такой полианионный компонент, как гликозаминогликаны (ГАГ) [7, 8]. *In vivo* агрегация А $\beta$  происходит в окружении разнообразных природных полианионов, включая ГАГ. Способность ГАГ стимулировать самоагрегацию А $\beta$  *in vitro* хорошо известна и подробно изучена (см., например, обзоры [9, 10]). Однако вопрос о том, каким образом ГАГ модулируют цинк-индуцированную агрегацию А $\beta$ , изучен слабо, несмотря на особое место, которое  $Zn^{2+}$  может занимать в патогенезе БА [3, 11]. Известно, что такой ГАГ, как гепарин, способен дестабилизировать цинк-индуцированные агрегаты А $\beta$ 40 (А $\beta$  длиной 40 а.о.) [12]. Недавно мы показали, что гепарин замедляет кинетику цинк-индуцированной агрегации изоформы А $\beta$  длиной 42 а.о. (А $\beta$ 42,) *in vitro*, что проявляется в уменьшении скорости роста среднего размера агрегатов пептида [13]. Предполагается, что взаимодействие полимерных молекул гепарина с поверхностью растущих агрегатов, создающее стерическое

Сокращения: БА – болезнь Альцгеймера; ГАГ – гликозаминогликан; А $\beta$  –  $\beta$ -амилоидный пептид; МСД – металлсвязывающий домен; а.о. – аминокислотный остаток (при цифре).

препятствие для присоединения олигомеров Аβ42, является одним из факторов, определяющих замедление кинетики цинк-индуцированной агрегации пептида. Наиболее вероятно, что связывание происходит за счет многовалентного взаимодействия отрицательно заряженных сульфогрупп полимерной молекулы гепарина с анионсвязывающими сайтами на поверхности агрегатов Аβ42, которые формируются при образовании комплексов  $Zn^{2+}$  с металлсвязывающим доменом пептида (МСД, N-концевой участок Аβ, состоящий из а.о. 1–16) [13]. Интересно, что ранее, используя пептид Аβ16 как модель МСД Аβ, мы обнаружили противоположный эффект замен Н6R и D7H (замены остатка гистидина в положении 6 полипептидной цепи на остаток аргинина и аспарагиновой кислоты в положении 7 на остаток гистидина, известные соответственно как “английская” [14] и “тайваньская” [15] мутации) на взаимодействие комплексов  $Zn^{2+}$ -Аβ16 с рядом природных полианионов (оцДНК и такие ГАГ, как хондроитинсульфат) – первая замена подавляла, а вторая усиливала это взаимодействие [16, 17].

В представленной работе мы исследовали влияние аминокислотных замен Н6R и D7H на цинк-индуцированную агрегацию полноразмерных пептидов в отсутствие и в присутствии такого распространённого ГАГ, как гепарин. Изучена роль взаимодействия гепарина с комплексами  $Zn^{2+}$ -МСД Аβ в модуляции гепарином цинк-индуцированной агрегации Аβ42. Поскольку цинк-индуцированная агрегация Аβ не приводит к формированию хорошо выраженной β-структурной организации пептидов в составе агрегатов [2], в качестве меры агрегации использовали средний характеристический размер агрегатов, который оценивали методом корреляционной спектроскопии. Этот метод широко используется для мониторинга агрегации Аβ, в том числе для изучения цинк-индуцированной агрегации [18]. Нами впервые показано, что мутации Н6R и D7H по-разному влияют на способность гепарина модулировать цинк-индуцированную агрегацию Аβ42. Полученные результаты указывают на определяющую роль взаимодействия гепарина с анионсвязывающими сайтами, которые формируются при образовании комплексов  $Zn^{2+}$ -МСД, в модулирующем эффекте гепарина. Также показано, что мутация Н6R снижает, а D7H повышает способность Аβ42 агрегировать под воздействием  $Zn^{2+}$ .

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы.** В работе использованы синтетические пептиды Аβ42 ( $NH_2$ -DAEFRHDS-GYEVNHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVIA-COOH), D7H-Аβ42 ( $NH_2$ -DAEFRHDS-GYEVNHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG

VVIA-COOH), Н6R-Аβ42 ( $NH_2$ -DAEFRRDS-GYEVNHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVIA-COOH), Аβ16, D7H-Аβ16 и Н6R-Аβ16 чистотой >95%, синтезированные компанией “Bio-peptide” (США). Точечные мутации выделены жирным шрифтом. Пептиды Аβ16, D7H-Аβ16 и Н6R-Аβ16 были ацетилированы и амидированы по N- и C-концам соответственно. Аминокислотные последовательности коротких пептидов соответствуют последовательностям МСД Аβ и его мутантных изоформ (подчеркнуты). Лиофилизированные пептиды хранили при  $-20^\circ C$ . Гепарин из слизистой оболочки кишок свиней приобретен в компании “Sigma-Aldrich” (США). Остальные реактивы, приобретенные в компаниях “Acros Organics” (Бельгия) и “Sigma-Aldrich”, имели чистоту, соответствующую квалификации х.ч. или выше. Для приготовления растворов использовали деионизованную воду ( $diH_2O$ ), полученную на установке Milli-Q (“Millipore”, США).  $diH_2O$  и буферные растворы перед использованием пропускали через фильтр с размером пор 0.22 мкм (“Millipore”).

**Приготовление растворов гепарина и пептидов.** Растворы гепарина требуемой концентрации в буфере А (10 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 6.8) готовили, смешивая концентрации буфера А и стоковый раствор гепарина в  $diH_2O$ . Стоковый раствор гепарина концентрацией 10 мг/мл готовили гравиметрическим способом.

Лиофилизаты полноразмерных пептидов для приготовления их растворов растворяли в гексафторизопропанолу в концентрации 3 мг/мл в течение 30 мин при  $37^\circ C$ . Аликвоты раствора высушивали в вакуумном испарителе Vacufuge 5301 (“Eppendorf”, Германия) и хранили при  $-20^\circ C$  до использования. Для получения водных растворов пептиды Аβ42, D7H-Аβ42 и Н6R-Аβ42, обработанные гексафторизопропанолом, растворяли в диметилсульфоксиде в концентрации 3 mM. Раствор разводили  $diH_2O$  до конечной концентрации пептидов 100 мкМ и хранили во льду. Раствор использовали в течение 3 ч.

Для получения цинк-индуцированных агрегатов пептидов растворы разводили концентратом буфера А, после чего концентрацию пептида доводили до 50 мкМ, добавляя буфер А или раствор гепарина. Инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин и добавляли равный объем буфера А, содержащего/не содержащего хлорид цинка. Размер агрегатов пептидов определяли через 10 мин после добавления  $Zn^{2+}$ . Конечная концентрация пептида в пробе составляла 25 мкМ, весовое отношение пептид : гепарин = 1 : 1 (110 мкг/мл гепарина), а концентрация  $Zn^{2+}$  варьировала в диапазоне от 1.6 до 150 мкМ.

Пептиды Аβ16, D7H-Аβ16 и Н6R-Аβ42 растворяли в  $diH_2O$ . Концентрацию пептидов определяли

ли спектрофотометрическим методом, основываясь на значении коэффициента молярной экстинкции тирозина  $\varepsilon_{276} = 1450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Растворы пептидов разводили концентратом буфера А, содержащего/ не содержащего хлорид цинка, и смешивали с раствором гепарина в буфере А, содержащем  $\text{Zn}^{2+}$  в такой же концентрации. Конечная концентрация пептидов составляла 150 мкМ.

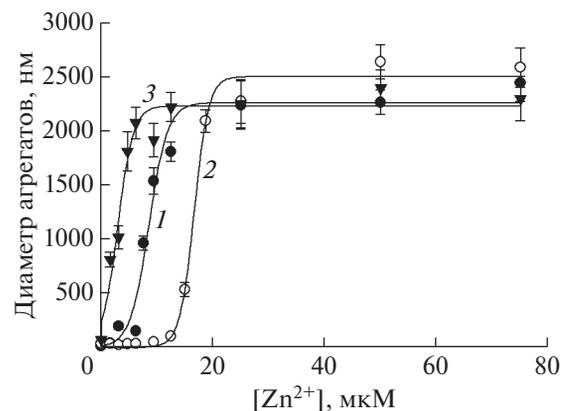
**Корреляционная спектроскопия и турбидиметрия.** Размер цинк-индуцированных агрегатов пептидов Аβ42, D7H-Аβ42 и Н6R-Аβ42 определяли методом корреляционной спектроскопии, используя анализатор размера частиц Zetasizer Nano ZS ("Malvern Instruments", Великобритания), позволяющий измерять диаметр частиц в диапазоне от 0,6 нм до 10 мкм. Измерения проводили при температуре 25°C согласно [19]. Метод корреляционной спектроскопии основан на определении коэффициента диффузии дисперсных частиц в жидкости путем анализа корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света. Форма частицы аппроксимируется сферой, и ее гидродинамический радиус (диаметр) определяется по формуле Стокса—Эйнштейна. Программное обеспечение анализатора Zetasizer Nano ZS позволяет получить распределение частиц в полидисперсной популяции по размеру и определить значение среднего диаметра частиц в популяции.

Мутность растворов Аβ16, D7H-Аβ16 и Н6R-Аβ42 в присутствии различных концентраций цинка и гепарина измеряли на спектрофотометре HP-8453 ("Agilent", США), определяя их оптическую плотность на длине волны 405 нм через 10 мин после добавления раствора, содержащего гепарин.

**Определение концентрации цинкона и комплексов цинкон-цинк.** В 1 мл  $\text{dH}_2\text{O}$  растворяли 1 мг цинкона (2-карбокси-2-окси-5-сульфоформазилбензол). Концентрацию цинкона в растворе контролировали спектрофотометрически, используя значение коэффициента молярной экстинкции  $\varepsilon_{488} = 26900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [20]. Концентрацию комплексов цинкон-цинк ( $[\text{Zi-Zn}]$ ) в присутствии и в отсутствие пептидов в буфере А определяли по величине оптического поглощения растворов на 620 нм, основываясь на значении коэффициента молярной экстинкции  $\varepsilon_{620} = 25050 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [20].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Зависимости среднего диаметра цинк-индуцированных агрегатов пептидов Аβ42, D7H-Аβ42 и Н6R-Аβ42 от концентрации  $\text{Zn}^{2+}$  представлены на рис. 1. Очевидно, что в случае Аβ42 и Н6R-Аβ42 зависимости имеют сигмоидный характер. При проведении сравнительных исследований все три экспериментальные зависимости были аппрок-



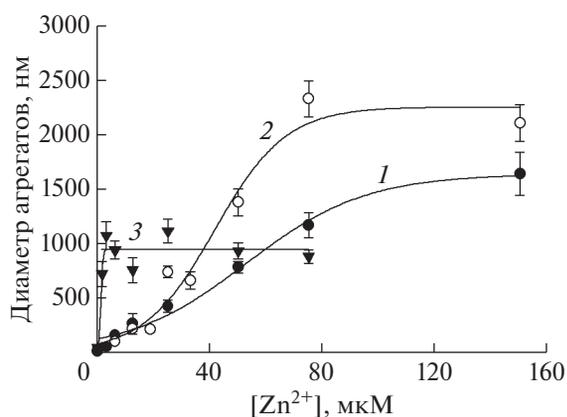
**Рис. 1.** Зависимость среднего диаметра цинк-индуцированных агрегатов Аβ42 и его изоформ от концентрации  $\text{Zn}^{2+}$  в растворе. Кривые 1, 2 и 3 — Аβ42, Н6R-Аβ42 и D7H-Аβ42 соответственно. Буфер А; концентрация пептидов — 25 мкМ. Показаны средние арифметические значения и стандартные отклонения для трех измерений.

симированы методом наименьших квадратов с использованием сигмоидной кривой, описываемой уравнением:

$$D = D_{\max} / (1 + e^{-(C - C_{1/2})/k}), \quad (1)$$

где  $D_{\max}$  — максимальное значение характеристического диаметра агрегатов, достигаемое в условиях эксперимента;  $C$  — молярная концентрация ионов цинка;  $C_{1/2}$  — концентрация ионов цинка, при которой средний диаметр агрегатов достигает половины значения  $D_{\max}$ ;  $k$  — нормировочная константа. Аппроксимацию проводили с помощью программы SigmaPlot, полагая  $D_{\max}$ ,  $C_{1/2}$  и  $k$  свободными параметрами. Сигмоидные кривые, показанные на рис. 1, получены в результате аппроксимации. Значения  $D_{\max}$  и  $C_{1/2}$  приведены в табл. 1. Как видно, значение  $C_{1/2}$  для Н6R-Аβ42 приблизительно в 2 раза больше, чем для Аβ42, а для D7H-Аβ42 — меньше почти в 3 раза (табл. 1). Таким образом, точечная замена D7H делает пептид значительно более склонным к цинк-индуцированной агрегации, в то время как замена Н6R — более устойчивым. При этом не выявлено существенных различий в максимальных размерах агрегатов ( $D_{\max}$ ) исследованных пептидов на момент измерения (табл. 1 и рис. 1).

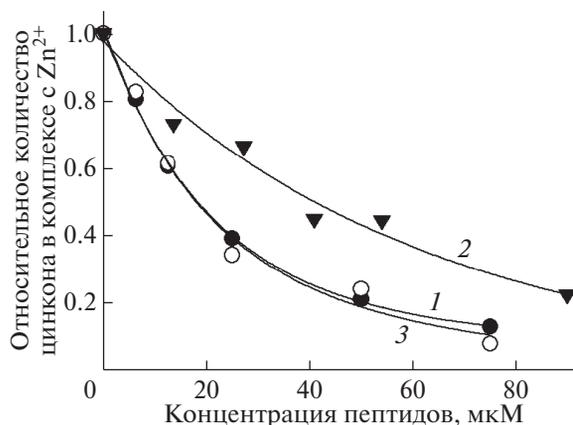
На рис. 2 представлены зависимости среднего диаметра цинк-индуцированных агрегатов пептидов Аβ42, D7H-Аβ42 и Н6R-Аβ42 от концентрации  $\text{Zn}^{2+}$  в присутствии гепарина (весовое соотношение пептид : гепарин = 1 : 1). При проведении сравнительных исследований экспериментальные зависимости, полученные в присутствии гепарина, также аппроксимировали сигмоидной кривой (уравнение 1), как описано выше. Видно, что присутствие гепарина в равном весовом



**Рис. 2.** Влияние гепарина на зависимость среднего диаметра цинк-индуцированных агрегатов Аβ42 и его изоформ от концентрации  $Zn^{2+}$  в растворе. Кривые 1, 2 и 3 – Аβ42, Н6R-Аβ42 и D7Н-Аβ42 соответственно. Буфер А; концентрации гепарина и пептидов – 110 мкг/мл и 25 мкМ соответственно (весовое соотношение гепарин/пептид = 1 : 1). Показаны средние арифметические значения и стандартные отклонения для трех измерений.

соотношении с пептидом Аβ42 (рис. 2) приводит к сдвигу зависимости размера агрегатов в область более высоких концентраций  $Zn^{2+}$  (величина  $C_{1/2}$  возросла более чем в 6 раз, табл. 1), при этом значение  $D_{max}$  также меняется, хотя и не столь значительно ( $D_{max}$  уменьшался менее чем в 1.5 раза, табл. 1). Мутация Н6R приводила к меньшему сдвигу зависимости диаметра агрегатов от концентрации  $Zn^{2+}$  под влиянием гепарина:  $C_{1/2}$  увеличилась в 2.5 раза, при этом конечный диаметр агрегатов практически совпадал (табл. 1 и рис. 2). Мутация D7Н более чем в 2 раза меняет значение  $D_{max}$  в присутствии гепарина (950 vs. 2225 нм, табл. 1), а также приблизительно в 2 раза уменьшает значение  $C_{1/2}$  (табл. 1).

На рис. 3 представлено относительное количество комплексов  $Zi-Zn$  в растворе, содержащем 60 мкМ цинкона и 30 мкМ  $Zn^{2+}$ , при разных концентрациях Аβ42 и его мутантных форм. Видно,



**Рис. 3.** Зависимость относительного количества цинкона в комплексе с  $Zn^{2+}$  от концентрации пептида. Буфер А; концентрации цинкона и  $Zn^{2+}$  – 60 и 30 мкМ соответственно. Кривые 1, 2 и 3 – Аβ42, Н6R-Аβ42 и D7Н-Аβ42 соответственно.

что для связывания одинакового количества  $Zn^{2+}$  в присутствии цинкона концентрация Н6R-Аβ42 должна быть практически в 2 раза выше, чем в случае Аβ42, тогда как у Аβ42 и D7Н-Аβ42 зависимости практически одинаковы.

Ранее мы показали [13], что в присутствии  $Zn^{2+}$  (1 мМ) гепарин вызывает агрегацию пептида Аβ16, что проявлялось в помутнении смесей пептид-цинк-гепарин. Мутность смесей резко возросла и выходила на плато при концентрации гепарина  $\approx 10$  мкг/мл [13]. Добавление  $Zn^{2+}$  в растворы пептидов Аβ16 и D7Н-Аβ16, содержащих гепарин в концентрации 10 мкг/мл, также приводило к увеличению их оптической плотности, причем мутность раствора пептида D7Н-Аβ16 возросла гораздо быстрее, выходя на насыщение при концентрации цинка  $\approx 350$  мкМ (рис. 4). Ни цинк, ни гепарин, взятые отдельно в использованных концентрациях, не вызывали помутнения раствора пептидов. Агрегация комплексов  $Zn^{2+}$  с Аβ16 и D7Н-Аβ16 однозначно указывает на их взаимодействие с молекулами гепарина, при-

**Таблица 1.** Значения максимального диаметра ( $D_{max}$ ) и концентраций ионов цинка ( $C_{1/2}$ ), при которых средний диаметр цинк-индуцированных агрегатов Аβ42, D7Н-Аβ42 и Н6R-Аβ42 достигает половины значения  $D_{max}$  в отсутствие и в присутствии гепарина (110 мкг/мл)

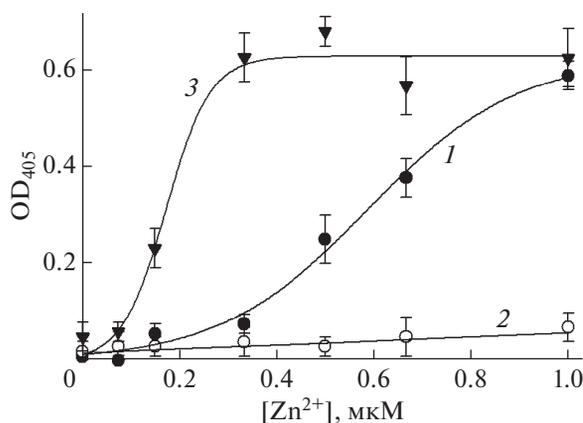
Гепарин	Пептид	$C_{1/2}$ , мкМ	$D_{max}$ , нм
В отсутствие гепарина	Аβ42	$8.5 \pm 0.4$	$2255 \pm 70$
	Н6R-Аβ42	$16.6 \pm 0.2$	$2495 \pm 43$
	D7Н-Аβ42	$3.0 \pm 0.3$	$2225 \pm 57$
В присутствии гепарина	Аβ42	$52 \pm 15$	$1639 \pm 286$
	Н6R-Аβ42	$42 \pm 3$	$2253 \pm 155$
	D7Н-Аβ42	$1.2 \pm 0.5$	$950 \pm 37$

чем в случае D7H-A $\beta$ 16 это взаимодействие проявляется при более низких концентрациях Zn<sup>2+</sup>. В отличие от пептидов A $\beta$ 16 и D7H-A $\beta$ 16 растворы H6R-A $\beta$ 16 практически не мутнели при добавлении Zn<sup>2+</sup> в присутствии гепарина (рис. 4).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На сегодняшний день предложено два механизма цинк-индуцированной олигомеризации A $\beta$ , в рамках которых олигомеризация может инициироваться либо межмолекулярным, либо внутримолекулярным связыванием Zn<sup>2+</sup> с A $\beta$  [21–23]. Предполагается, что в первом случае олигомеризация A $\beta$  происходит через образование “цинковых мостиков”, где каждый ион цинка в комплексе с пептидами координирован парами аминокислотных остатков Н6/Н13 или Н14/Е11 двух пептидов [21], а во втором – через структурную реорганизацию С-концевого участка пептида (вызванную структурированием МСД при координации Zn<sup>2+</sup>), которая усиливает склонность пептида к агрегации [22, 23]. Возможно, что эти два механизма не исключают, а дополняют друг друга. Цинк-индуцированная олигомеризация A $\beta$ , по-видимому, определяет первую (быструю, менее 1 мин в условиях *in vitro*) фазу агрегации, после которой наступает вторая фаза, в которой происходит относительно медленная ассоциация сформированных высокомолекулярных олигомеров в большие (диаметром 1–2 мкм) агрегаты A $\beta$  [6]. Следует отметить, что МСД A $\beta$  не имеет упорядоченной пространственной структуры в водных растворах при pH ~ 7, но приобретает ее при координации Zn<sup>2+</sup> [24]. Это приводит к неравномерному распределению плотности положительного заряда и формированию анионсвязывающего сайта [16, 24]. Структура сайта может различаться у разных изоформ A $\beta$ , что проявляется в различной эффективности взаимодействия природных полианионов с соответствующими изоформами пептида A $\beta$ 16 в комплексе с Zn<sup>2+</sup> [16].

Изучение формирования мономерных комплексов Zn<sup>2+</sup>-A $\beta$ 16 показало, что Zn<sup>2+</sup> координирован в МСД A $\beta$  остатками гистидина (Н6, Н13 и Н14) и глутаминовой кислоты (Е11) [25]. В отсутствие Н6, как в случае мутации Н6R, координационная сфера не может быть завершена, что должно приводить к формированию менее стабильного комплекса. Известно также, что замена Н6R вызывает образование димеров Zn<sup>2+</sup>-(Н6R-A $\beta$ 16)<sub>2</sub>, неспособных к последующей олигомеризации через “цинковые мостики” из-за дефектности пары Н6/Н13 [21]. Следует отметить, что отсутствие Н6 может быть компенсировано другими аминокислотными остатками (такими, как D1, E3, D7), которые потенциально могут участвовать в координации Zn<sup>2+</sup>, хотя и с меньшей эф-



**Рис. 4.** Зависимость мутности (оптическая плотность на длине волны 405 нм) растворов A $\beta$ 16, H6R-A $\beta$ 16 и D7H-A $\beta$ 16 от концентрации Zn<sup>2+</sup> в присутствии гепарина (10 мкг/мл). Кривые 1, 2 и 3 – A $\beta$ 16, H6R-A $\beta$ 16 и D7H-A $\beta$ 16 соответственно. Буфер А; концентрация пептидов – 150 мкМ. Показаны средние арифметические значения и стандартные отклонения для трех измерений.

фективностью [26]. Таким образом, наблюдаемое нами двукратное увеличение концентрации Zn<sup>2+</sup>, требуемой для формирования цинк-индуцированных агрегатов H6R-A $\beta$ 42, сопоставимых по размеру с агрегатами A $\beta$ 42 на момент измерения (рис. 1 и табл. 1), по-видимому, связано с меньшей стабильностью комплексов H6R-A $\beta$ 42 с Zn<sup>2+</sup> в сравнении с A $\beta$ 42. Это предположение поддерживается тем, что для связывания одинакового количества Zn<sup>2+</sup> в присутствии цинкона концентрация H6R-A $\beta$ 42 должна быть практически в 2 раза выше, чем в случае A $\beta$ 42 (рис. 3).

Мутация Н6R “смягчает” влияние гепарина на цинк-индуцированную агрегацию: относительный сдвиг зависимости размера агрегатов H6R-A $\beta$ 42 от концентрации Zn<sup>2+</sup> меньше, чем у A $\beta$ 42, и они успевают достигнуть максимальных размеров при высоких концентрациях цинка (кривые 1 и 2, рис. 1 vs. рис. 2 и табл. 1). В рамках предложенного нами ранее механизма ингибирования гепарином цинк-индуцированной агрегации A $\beta$  [13] через мультивалентное взаимодействие отрицательно заряженных полимеров гепарина с анионсвязывающими сайтами на поверхности агрегатов – “смягчение” модулирующего эффекта гепарина указывает на то, что он связывается с цинк-индуцированными агрегатами H6R-A $\beta$ 42 менее эффективно, чем с агрегатами A $\beta$ 42. Действительно, эффективность мультивалентного взаимодействия определяется эффективностью взаимодействия сульфогрупп гепарина с отдельными анионсвязывающими сайтами на поверхности агрегата. Как видно из рис. 4, гепарин не взаимодействует с H6R-A $\beta$ 16 в присутствии Zn<sup>2+</sup> в использованных условиях, вероятно, в силу недостаточной стабиль-

ности комплекса  $Zn^{2+}$ - (H6R-A $\beta$ 16) в сравнении с интактным A $\beta$ 16, Значение  $K_d$  такого комплекса в 7 раз выше [25, 27]. Очевидно, комплексы  $Zn^{2+}$  с H6R-A $\beta$ 42, экспонированные на поверхности цинк-индуцированного агрегата (а, следовательно, и анионсвязывающие сайты, формируемые координацией цинка в МСД пептида), будут также характеризоваться низкой стабильностью (при этом сами пептиды могут удерживаться в составе агрегата в силу дополнительных взаимодействий между их С-концевыми доменами). Снижение стабильности анионсвязывающих сайтов в цинк-индуцированных агрегатах H6R-A $\beta$ 42 в сравнении с агрегатами A $\beta$ 42 должно уменьшить эффективность связывания гепарина, что может объяснить различия во влиянии гепарина на характер цинк-индуцированной агрегации пептидов H6R-A $\beta$ 42 и A $\beta$ 42.

В отличие от H6R, замена D7H не приводила к видимому изменению сродства  $Zn^{2+}$  к A $\beta$  (рис. 3), но, тем не менее, существенно сказывалась на цинк-индуцированной агрегации пептида (кривая 1 vs. кривой 3, рис. 2). Известно, что такая замена может значительно изменить характер связывания  $Zn^{2+}$  с пептидом. Действительно, как мы недавно показали [28], фрагменты 1–7 или 1–10 МСД A $\beta$  с аминокислотной заменой D7H формируют стабильные димеры в присутствии  $Zn^{2+}$ , в которых не один, а два иона цинка координированы остатками D1, E3, H6 и H7 двух пептидов. Можно предположить, что такая координация  $Zn^{2+}$  в МСД с мутацией D7H стимулирует более эффективную олигомеризацию D7H-A $\beta$ 42 и/или ассоциацию олигомеров пептида в агрегаты микронного размера, сдвигая таким образом зависимость размера агрегатов в область более низких значений концентраций цинка (рис. 1 и табл. 1).

Формальный анализ влияния замены D7H на модуляцию цинк-индуцированной агрегации A $\beta$  гепарином показывает, что эта замена имеет двоякий эффект. С одной стороны, величина  $D_{max}$  для D7H-A $\beta$ 42 существенно ниже в присутствии гепарина, чем в его отсутствие. С другой стороны, зависимость сдвигается в область более низких значений концентрации  $Zn^{2+}$  под воздействием гепарина, если судить по значениям  $C_{1/2}$ , в противоположность влиянию гепарина на цинк-индуцированную агрегацию A $\beta$ 42 (табл. 1). Однако снижение  $C_{1/2}$  может быть артефактом, связанным с выбранным способом обработки экспериментальных данных. Действительно, в присутствии гепарина размер агрегатов D7H-A $\beta$ 42 фактически перестает меняться как функция концентрации  $Zn^{2+}$ , начиная с 3 мкМ (рис. 2), что формально проявляется как сдвиг  $C_{1/2}$  в сторону меньшего значения при аппроксимации экспериментальной зависимости сигмоидной кривой. Тем не менее, суще-

ственная разница в размерах агрегатов D7H-A $\beta$ 42 (достигнутых ко времени измерения) в присутствии и в отсутствие гепарина, наблюдаемая в интервале концентраций  $Zn^{2+}$  от  $\approx 6$  до 75 мкМ, не вызывает сомнений (кривая 3, рис. 1 vs. рис. 2). Очевидно, она отражает более эффективное связывание отрицательно заряженных полимеров гепарина с поверхностью цинк-индуцированных агрегатов D7H-A $\beta$ 42 в сравнении с A $\beta$ 42. Наиболее вероятная причина этого – другая структурная организация комплекса  $Zn^{2+}$  с МСД в случае D7H-A $\beta$ 42. Действительно, координация двух ионов цинка вместо одного должна привести к более высокой локальной плотности положительного заряда, тем самым усиливая взаимодействие каждого отдельного анионсвязывающего сайта на поверхности агрегатов D7H-A $\beta$ 42 с сульфогруппами гепарина. Это предположение находится в согласии с наблюдаемым нами более выраженным взаимодействием гепарина с D7H-A $\beta$ 16 в присутствии  $Zn^{2+}$  (рис. 4).

Таким образом, в представленной работе впервые показано, что аминокислотные замены H6R и D7H, известные как “английская” и “тайваньская” мутации, по-разному влияют на модулирующий эффект гепарина на цинк-индуцированную агрегацию A $\beta$ . Эти различия могут быть объяснены различиями в координации  $Zn^{2+}$  при его связывании с МСД исследованных изоформ A $\beta$ 42, что подчеркивает определяющую роль анионсвязывающих сайтов, формируемых комплексами  $Zn^{2+}$ -МСД A $\beta$ , во взаимодействии гепарина с цинк-индуцированными агрегатами пептида.

В работе использовано оборудование ЦКП “Протеом человека” (ИБМХ).

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума Российской академии наук “Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Haass C., Selkoe D.J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**, 101–112.
2. Faller P., Hureau C., Berthoumieu O. (2013) Role of metal ions in the self-assembly of the Alzheimer's amyloid- $\beta$  peptide. *Inorg. Chem.* **52**, 12193–12206.
3. Куликова А.А., Макаров А.А., Козин С.А. (2015) Роль ионов цинка и структурного полиморфизма  $\beta$ -амилоида в инициации болезни Альцгеймера. *Молекуляр. биология.* **49**, 249–263.

4. Lovell M.A., Robertson J.D., Teesdale W.J., Campbell J.L., Markesbery W.R. (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J. Neurol. Sci.* **158**, 47–52.
5. Miller L.M., Wang Q., Telivala T.P., Smith R.J., Lanzirrotti A., Miklossy J. (2006) Synchrotron-based infrared and x-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with  $\beta$ -amyloid deposits in Alzheimer's disease. *J. Struct. Biol.* **155**, 30–37.
6. Suprun E.V., Radko S.P., Kozin S.A., Mitkevich V.A., Makarov A.A. (2018) Electrochemical detection of Zn(II)-induced amyloid- $\beta$  aggregation: insights into aggregation mechanisms. *J. Electroanal. Chem.* **830–831**, 34–42.
7. O'Callaghan P., Sandwall E., Li J.P., Yu H., Ravid R., Guan Z.Z., van Kuppevelt T.H., Nilsson L.N., Ingelsson M., Hyman B.T., Kalimo H., Lindahl U., Lannfelt L., Zhang X. (2008) Heparan sulfate accumulation with A $\beta$  deposits in Alzheimer's disease and Tg2576 mice is contributed by glial cells. *Brain Pathol.* **18**, 548–561.
8. Bruinsma I.B., te Riet L., Gevers T., ten Dam G.B., van Kuppevelt T.H., David G., Kusters B., de Waal R.M., Verbeek M.M. (2010) Sulfation of heparan sulfate associated with amyloid- $\beta$  plaques in patients with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **119**, 211–220.
9. Ariga T., Miyatake T., Yu R.K. (2010) Role of proteoglycans and glycosaminoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and related disorders: amyloidogenesis and therapeutic strategies – a review. *J. Neurosci. Res.* **88**, 2303–2315.
10. Bergamaschini L., Rossi E., Vergani C., De Simoni M.G. (2009) Alzheimer's disease: another target for heparin therapy. *Sci. World J.* **9**, 891–908.
11. Bush A.I., Tanzi R.E. (2008) Therapeutics for Alzheimer's disease based on the metal hypothesis. *Neurotherapeutics.* **5**, 421–432.
12. Yoshiike Y., Tanemura K., Murayama O., Akagi T., Murayama M., Sato S., Sun X., Tanaka N., Takashima A. (2001) New insights on how metals disrupt amyloid  $\beta$ -aggregation and their effects on amyloid- $\beta$  cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **276**, 32293–32299.
13. Radko S.P., Khmeleva S.A., Mantsyzov A.B., Kiseleva Y.Y., Mitkevich V.A., Kozin S.A., Makarov A.A. (2018) Heparin modulates the kinetics of zinc-induced aggregation of amyloid- $\beta$  peptides. *J. Alzheimers Dis.* **63**, 539–550.
14. Janssen J.C., Beck J.A., Campbell T.A., Dickinson A., Fox N.C., Harvey R.J., Houlden H., Rossor M.N., Collinge J. (2003) Early onset familial Alzheimer's disease: mutation frequency in 31 families. *Neurology.* **60**, 235–239.
15. Chen W.T., Hong C.J., Lin Y.T., Chang W.H., Huang H.T., Liao J.Y., Chang Y.J., Hsieh Y.F., Cheng C.Y., Liu H.C., Chen Y.R., Cheng I.H. (2012) Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) D7H mutation increases oligomeric A $\beta$ 42 and alters properties of A $\beta$ -zinc/copper assemblies. *PLoS One.* **7**, e35807.
16. Хмельва С.А., Мезенцев Ю.В., Козин С.А., Митькевич В.А., Медведев А.Е., Иванов А.С., Бодоев Н.В., Макаров А.А., Радько С.П. (2015) Влияние мутаций и модификаций аминокислотных остатков на цинк-индуцированное взаимодействие металлсвязывающего домена  $\beta$ -амилоида с ДНК. *Молекуляр. биология.* **49**, 507–514.
17. Хмельва С.А., Козин С.А., Киселёва Я.Ю., Митькевич В.А., Макаров А.А., Радько С.П. (2016) Цинк-индуцированное взаимодействие металлсвязывающего домена  $\beta$ -амилоида с нуклеиновыми кислотами и гликозаминогликанами. *Молекуляр. биология.* **50**, 1049–1052.
18. Радько С.П., Хмельва С.А., Супрун Е.В., Козин С.А., Бодоев Н.В., Макаров А.А., Арчаков А.И., Шумянцева В.В. (2015) Физико-химические методы исследования агрегации  $\beta$ -амилоида. *Биомед. химия.* **61**, 203–218.
19. Suprun E.V., Khmeleva S.A., Kiseleva Y.Y., Radko S.P., Archakov A.I., Shumyantseva V.V. (2016) Quantitative aspects of electrochemical detection of amyloid- $\beta$  aggregation. *Electroanalysis.* **28**, 1977–1983.
20. Sabel C.E., Neureuther J.M., Siemann S. (2010) A spectrophotometric method for the determination of zinc, copper, and cobalt ions in metalloproteins using zincon. *Anal. Biochem.* **397**, 218–226.
21. Istrate A.N., Kozin S.A., Zhokhov S.S., Mantsyzov A.B., Kechko O.I., Pastore A., Makarov A.A., Polshakov V.I. (2016) Interplay of histidine residues of the Alzheimer's disease A $\beta$  peptide governs its Zn-induced oligomerization. *Sci. Rep.* **6**, 21734.
22. Olofsson A., Lindhagen-Persson M., Vestling M., Sauer-Eriksson A.E., Ohman A. (2009) Quenched hydrogen/deuterium exchange NMR characterization of amyloid- $\beta$  peptide aggregates formed in the presence of Cu<sup>2+</sup> or Zn<sup>2+</sup>. *FEBS J.* **276**, 4051–4060.
23. Lim K.H., Kim Y.K., Chang Y.T. (2007) Investigations of the molecular mechanism of metal-induced A $\beta$  (1–40) amyloidogenesis. *Biochemistry.* **46**, 13523–13532.
24. Zirah S., Kozin S.A., Mazur A.K., Blond A., Cheminant M., Segalas-Milazzo I., Debey P., Rebuffat S. (2006) Structural changes of region 1–16 of the Alzheimer disease amyloid  $\beta$ -peptide upon zinc binding and *in vitro* aging. *J. Biol. Chem.* **281**, 2151–2161.
25. Tsvetkov P.O., Kulikova A.A., Golovin A.V., Tkachev Y.V., Archakov A.I., Kozin S.A., Makarov A.A. (2010) Minimal Zn<sup>2+</sup> binding site of amyloid- $\beta$ . *Biophys. J.* **99**, L84–L86.
26. Miller Y., Ma B., Nussinov R. (2012) Metal binding sites in amyloid oligomers: complexes and mechanisms. *Coord. Chem. Rev.* **256**, 2245–2252.
27. Kozin S.A., Kulikova A.A., Istrate A.N., Tsvetkov P.O., Zhokhov S.S., Mezentsev Y.V., Kechko O.I., Ivanov A.S., Polshakov V.I., Makarov A.A. (2015) The English (H6R) familial Alzheimer's disease mutation facilitates zinc-induced dimerization of the amyloid- $\beta$  metal-binding domain. *Metallomics.* **7**, 422–425.
28. Polshakov V.I., Mantsyzov A.B., Kozin S.A., Adzhubei A.A., Zhokhov S.S., van Beek W., Kulikova A.A., Indeykina M.I., Mitkevich V.A., Makarov A.A. (2017) A binuclear zinc interaction fold discovered in the homodimer of Alzheimer's amyloid- $\beta$  fragment with Taiwanese mutation D7H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **56**, 11734–11739.

## EFFECTS OF H6R AND D7H MUTATIONS ON THE MODULATION OF ZINC-INDUCED AGGREGATION OF AMYLOID- $\beta$ BY HEPARIN

S. P. Radko<sup>1,2, \*</sup>, S. A. Khmeleva<sup>2</sup>, Y. Y. Kiseleva<sup>3</sup>, S. A. Kozin<sup>1</sup>,  
V. A. Mitkevich<sup>1</sup>, A. A. Makarov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

<sup>2</sup>*Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, 119121 Russia*

<sup>3</sup>*Russian Scientific Center of Rentgenoradiology, Moscow, 117485 Russia*

\*e-mail: radkos@yandex.ru

Zinc ions and glycosaminoglycans (GAGs) are found in amyloid deposits and known to modulate the  $\beta$ -amyloid peptide (A $\beta$ ) aggregation which is considered as a key event of the Alzheimer's disease pathogenesis. Using correlation spectroscopy, we have studied effects of H6R and D7H mutations in the metal-binding domain (MBD) of A $\beta$ 42 on the modulation of its zinc-induced aggregation by heparin, a model GAG. The H6R mutation was shown to decrease, while D7H to increase the A $\beta$ 42 propensity to aggregate in the presence of zinc ions. It was also found that H6R mutation diminishes whereas the D7H mutation enhances the modulating effect of heparin. Differential impacts of these mutations on the heparin modulation arise from alterations in the coordination of zinc ions within MBDs of the mutant peptides. This study suggests essential role of anion-binding sites formed by complexes of zinc ions with A $\beta$  MBD in the interaction zinc-induced A $\beta$  aggregates with heparin.

**Keywords:** Alzheimer disease, beta-amyloid, zinc, aggregation, glycosaminoglycans